



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

SPEKTROMETRICKÉ METODY PRO VÝZKUM HUMINOVÝCH LÁTEK

SPECTROMETRIC METHODS FOR RESEARCH OF HUMIC SUBSTANCES

AUTOREFERÁT DIZERTAČNÍ PRÁCE
SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Ing. Vojtěch Enev

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

BRNO 2015

OBSAH

1 ÚVOD	4
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	5
2.1 UV/Vis spektrometrie HL a DOM.....	5
2.2 FTIR spektrometrie HL a DOM.....	6
2.3 Fluorescenční spektrometrie HL a DOM.....	7
2.3.1 Ustálená fluorescenční spektrometrie.....	7
2.3.2 Časově rozlišená fluorescenční spektrometrie.....	9
2.4 ¹³ C NMR spektrometrie HL a DOM.....	10
3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	12
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	13
4.1 Zdroje huminových látek	13
4.1.1 Další zdroje huminových látek.....	13
4.2 Izolace huminových kyselin.....	13
4.3 Elementární analýza	13
4.4 UV/Vis spektrometrie	13
4.5 FTIR spektrometrie	14
4.6 Ustálená fluorescenční spektrometrie	14
4.6.1 Zhášení fluorescence.....	15
4.7 Časově rozlišená fluorescenční spektrometrie	15
4.8 ¹³ C spektrometrie nukleární magnetické resonance	15
5 DISKUZE NEJVÝZNAMNĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ	17
5.1 Elementární a DOC analýza huminových látek	17
5.2 UV/Vis spektrometrie huminových látek	19
5.3 FTIR spektrometrie huminových látek	21
5.4 Fluorescenční spektrometrie huminových látek	25
5.4.1 Excitační a emisní spektra huminových látek	25
5.4.2 Excitačně-emisní spektra huminových látek	27
5.4.3 Fluorescenční koeficienty	30
5.4.4 Statické zhášení fluorescence ligandů HL s Cu ²⁺ , Pb ²⁺ a Hg ²⁺ ionty	32
5.4.5 Časově rozlišená fluorescenční spektrometrie huminových látek.....	33

5.5	^{13}C NMR spektrometrie huminových látek	35
6	ZÁVĚR	39
7	LITERATURA	41
8	ŽIVOTOPIS	46

MÍSTO ULOŽENÍ

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, Purkyňova
464/118, 612 00 Brno, Česká republika

1 ÚVOD

Tradičně jsou huminové látky (HL) pokládány za “*biokoloidní*” sloučeniny, které společně s ostatními frakcemi DOM (*Dissolved Organic Matter*) tvoří nedílnou součást organické hmoty (OM). Jestliže si uvědomíme, kde všude se s těmito látkami můžeme setkat, jedná se bezesporu o nejvíce rozšířený organický materiál na zemském povrchu. Jednotlivé frakce HL (HK – huminové kyseliny, FK – fulvinové kyseliny a v neposlední řadě nerozpustné huminy) se ve svém přirozeném prostředí vyskytují v různých formách. V přírodních ekosystémech se HL nejčastěji vyskytují v pevné, nerozpuštěné formě, kde jsou součástí tzv. organominerálního komplexu, nebo se mohou nacházet ve formě koloidních roztoků (jako hlavní frakce rozpuštěného organického uhlíku DOC přirozeně se vyskytujícího v půdních a vodních ekosystémech). Pozoruhodné vlastnosti HL resp. DOM (samočištění a vazba CO₂ v půdě, pufovací a sorpční schopnost, biologická aktivita, ...) jsou lidské společnosti známy již několik desetiletí, vzhledem k tomu, že je publikováno mnoho odborných prací, které se věnují této problematice. I když je studiu HL stále věnována značná část vědeckého zájmu, je znalost struktury těchto látek, stejně jako ligninu doposud ne zcela objasněná. Obecně můžeme říci, že čím více nejasností se objevuje v otázkách struktury a geneze HL resp. DOM, tím více je značná část vědeckého zájmu fokusována na oblasti aplikačního potenciálu těchto látek v nejrůznějších oblastech lidské činnosti, ať už se jedná o průmysl, zemědělství, ochranu životního prostředí či biomedicínské aplikace.

Pro studium budoucích aplikací je nezbytně nutná znalost struktury a reaktivity těchto unikátních “*biokoloidních*” sloučenin. Jeden z možných způsobů představuje využití nedestruktivních analytických metod: molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/Vis), infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), ¹³C spektrometrie nukleární magnetické rezonance (¹³C NMR), ustálená (steady-state) a časově rozlišená fluorescenční spektrometrie. Obecně nám tyto spektrometrické techniky poskytují mnoho cenných informací týkajících se struktury, reaktivity a fyzikálně-chemických vlastností HL a DOM.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Jeden z možných způsobů jak mohou být tyto unikátní “biokoloidní” sloučeniny studovány a charakterizovány představuje využití nedestruktivních analytických metod: molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/Vis), infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), ^{13}C spektrometrie nukleární magnetické rezonance (^{13}C NMR), ustálená (steady-state) a časově rozlišená fluorescenční spektrometrie.

2.1 UV/Vis SPEKTROMETRIE HL A DOM

Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/Vis) je stále běžně používanou technikou při studiu HL a DOM [1]. UV/Vis spektra HL patří k nejlépe prostudovaným, a proto jsou mnohými autory využívány k základní charakterizaci jejich vlastností. Cenné informace o povaze HL resp. DOM je možné získat z tzv. *absorpčních koeficientů*, které jsou definovány jako poměry absorbancí při vhodně zvolených vlnových délkách [2–10]. Tradičně se používá především poměr E_4/E_6 , který je znám jako tzv. *humifikační index*. Tento absorpční koeficient je definován jako poměr absorbancí při vlnových délkách 465 a 665 nm. Podle Chena a spol. [2] hodnota humifikačního indexu klesá s molekulovou hmotností HL a je závislá na pH roztoku. Tento absorpční koeficient rovněž vypovídá o stupni kondenzace aromatických jader ve struktuře HL. Musíme si uvědomit, že toto tvrzení se výhradně opírá o korelace mezi humifikačním indexem (E_4/E_6) a střední molekulovou hmotností (\overline{M}_w) studovaných HL. Terestriální HK mají zpravidla hodnoty E_4/E_6 nízké (3–4,5), kdežto FK pocházející z pozemních přírodních matric jsou charakterizovány vyššími hodnotami humifikačního indexu (6–8,5). Je ovšem třeba mít na zřeteli, že velmi nízká absorbance při 665 nm zatěžuje absolutní hodnotu tohoto parametru již značnou chybou. Z tohoto důvodu byl navržen ekvivalentní absorpční koeficient E_2/E_4 , který je definován jako poměr absorbancí při 265 a 465 nm [3].

Kumada a spol. [4–5] rozdělil půdní HK na základě hodnot absorpčního koeficientu $\Delta \log K$ na typy: A, B a Rp. Tento absorpční koeficient vychází z rozdílu logaritmických hodnot absorbancí při 400 nm ($E_4^{1\%}$) a 600 nm ($E_6^{1\%}$).

Peuravuori a spol. [1, 6] definoval spojitost mezi navrhovaným absorpčním koeficientem E_2/E_3 a molekulovou hmotností HL a DOM, eventuálně stupněm aromaticity. Obecně platí, že s klesající hodnotou absorpčního koeficientu E_2/E_3 roste aromaticita a molekulová hmotnost HL. Obdobných výsledků bylo dosaženo v práci Bakera a spol. [7], kterým byla ověřena spojitost mezi absorpčním koeficientem E_{254}/E_{410} ($A_{254\text{ nm}}/A_{410\text{ nm}}$) a molekulovou hmotností rozličných vzorků DOM [8].

Dalším strukturním parametrem, který je definován na základě UV/Vis spekter HL a DOM, je absorpční koeficient $E_{\text{ET}}/E_{\text{Bz}}$. Tento koeficient vychází z poměru absorbancí při 253 nm (substituenty přenosu náboje) a 203 nm (benzenoidních struktur). Tento absorpční koeficient je výrazně citlivý k přítomnosti polárních substituentů na aromatickém jádře a poskytuje tedy informace o typu substituentů ve struktuře HL. Zvýšení obsahu polárních funkčních skupin (–OH, –COOH, –C=O a –O–) vede k výraznému zvýšení absorbance při 253 nm a tím také k růstu absorpčního koeficientu $E_{\text{ET}}/E_{\text{Bz}}$. Např. vyšší obsah alifatických substituentů se projeví nižšími hodnotami tohoto poměru. Podrobně se monitoringu vlastností HL a DOM prostřednictvím uvedeného absorpčního koeficientu věnují reference [9–10]. Absorbance při 203 nm může být nepříznivě ovlivněna přítomností dusičnanových aniontů ve vzorku HL, proto Korshin a spol. [9] definoval další absorpční koeficienty E_{253}/E_{220} (A_{253}/A_{220}) a E_{253}/E_{230} (A_{253}/A_{230}), které jsou v dobré korelaci s $E_{\text{ET}}/E_{\text{Bz}}$.

Cenné informace o struktuře HL resp. DOM můžeme získat z tzv. *specifických absorbancí* (A_{280} [11], A_{285} [12] a $SUVA_{254}$ [13]), které jsou definovány při různých λ_{Abs} , nejčastěji však v UV-oblasti absorpčního spektra. Chin a spol. [11] našel spojitost mezi navrženou specifickou absorbancí A_{280} a molekulovou hmotností (stupněm aromaticity) HL izolovaných z vzorků přírodních vod. Obdobných výsledků bylo dosaženo v práci Weishaara [13], kterým byla definována specifická absorpce $SUVA_{254}$ jako poměr A_{254} nm k celkovému obsahu organického uhlíku TOC ve vzorku.

2.2 FTIR SPEKTROMETRIE HL A DOM

Infračervená spektrometrie (IR), resp. infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) je stále běžně používanou technikou při studiu HL a DOM izolovaných z rozličných přírodních matric [14]. FTIR spektrometrie se vyznačuje snadností a rychlostí obsluhy přístroje, rozsáhlým počtem publikovaných prací týkajících se infračervených spekter HL a DOM, požadavkem malého množství vzorku 1–2 mg a především možností spojení FTIR s dalšími technikami (TG/FTIR, Py/GC/FTIR a GC/FTIR/MS) [15–18]. I přes složitou strukturu HL pozorujeme v jejich infračervených spektrech celou řadu absorpčních pásů, které odpovídají jednotlivým funkčním skupinám. Infračervená spektrometrie poskytuje cenné informace o struktuře a povaze HL resp. DOM, jejich reaktivitě, prostorovém uspořádání funkčních skupin, podílu sacharidových a proteinových jednotek atd.

V některých případech komplikují interpretaci infračervených spekter HL překrývající se pásy jednotlivých funkčních skupin. Tuto nevýhodu lze s obezřetným přístupem řešit pomocí tzv. *Fourierovy autodekonvoluce* (Fourier self-deconvolution) případně metodou proložení křivky [19–21].

Stevenson [22] upozorňuje, že za jistých podmínek KBr katalyzuje dekarboxylaci kyselých funkčních skupin, případně jejich deprotonizaci. Alternativou je využití jevu difuzního odrazu, v odborné literatuře označovaného jako DRIFTS (*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*), nebo jedno-odrazové reflexe na nástavci ATR (*Attenuated Total Reflection*) [14, 23–26].

V infračervených spektrech nativních HL, případně vzorků DOM můžeme nalézt celou řadu fundamentálních pásů, které jsou charakteristické pro jednotlivé funkční skupiny.

Absorpční pás v oblasti $3400\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ odpovídá valenčním vibracím --OH skupin. Hydroxylové skupiny velmi ochotně tvoří v HL vodíkové můstky a poskytují tak velmi široký pás, který znesnadňuje identifikaci aromatických struktur v oblasti $\approx 3030\text{ cm}^{-1}$. V rozmezí vlnočtů $2900\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ se nachází oblast specifické absorpce alifatických funkčních skupin (--CH , --CH_2 a --CH_3). V infračervených spektrech nativních HL můžeme nalézt absorpční pásy v oblasti $\approx 2920\text{ cm}^{-1}$ a $\approx 2850\text{ cm}^{-1}$, které odpovídají asymetrickým a symetrickým valenčním vibracím methylenových funkčních skupin. Absorpční pás v oblasti $\approx 2960\text{ cm}^{-1}$ je charakteristický pro methylované a acetylované HK, který připadá asymetrickým vibracím --CH_3 skupin. Ostrý pás lokalizovaný v oblasti $\approx 1725\text{--}1710\text{ cm}^{-1}$ náleží valenčním vibracím karbonylových funkčních skupin v karboxylových kyselinách. Soli HL (*humáty* a *fulváty*) jsou charakterizovány absorpčními pásy v oblasti $\approx 1550\text{ cm}^{-1}$ a $\approx 1400\text{ cm}^{-1}$, které odpovídají symetrickým a asymetrickým vibracím karboxylátového aniontu COO^- . V případě methylovaných HK můžeme v FTIR spektrech pozorovat absorpční pásy v oblasti $1785\text{--}1735\text{ cm}^{-1}$ náležící vibracím karbonylových funkčních skupin v methyl esterech. V infračervených spektrech acetylovaných HK můžeme identifikovat specifické absorpční pásy při $\approx 1840\text{ cm}^{-1}$, $\approx 1815\text{ cm}^{-1}$, $\approx 1775\text{ cm}^{-1}$ a $\approx 1740\text{ cm}^{-1}$, které

odpovídají vibracím karbonylových funkčních skupin v cyklických anhydridech, případně v acetanhydridech. Interpretace absorpčního pásu v oblasti $\approx 1610 \text{ cm}^{-1}$ je poněkud složitější v důsledku specifických absorpcí strukturně odlišných funkčních skupin. Obecně je tento absorpční pás připisován vibracím konjugovaných dvojných vazeb ($\text{C}=\text{C}$) v aromatických strukturách HL. Musíme si uvědomit, že v této oblasti infračerveného spektra rovněž absorbují sloučeniny chinoidního charakteru. Absorpční pás v oblasti $1690\text{--}1635 \text{ cm}^{-1}$ náleží vibracím karbonylových funkčních skupin v chinonech, případně konjugovaných ketonech. V případě lokalizace širokého absorpčního pásu v této oblasti IČ spektra ($1690\text{--}1600 \text{ cm}^{-1}$) musíme brát v úvahu všechny tyto aspekty. V FTIR spektrech nativních HL můžeme nalézt ostrý absorpční pás v oblasti 1500 cm^{-1} , který náleží valenčním vibracím jednoduchých aromatických struktur. Absorpční pás lokalizovaný v oblasti $1460\text{--}1450 \text{ cm}^{-1}$ je obvykle připisován deformačním vibracím alifatických funkčních skupin. V infračervených spektrech těchto látek můžeme rovněž nalézt absorpční pás při $\approx 1400 \text{ cm}^{-1}$, který odpovídá deformačním vibracím hydroxylových skupin a vibracím $\text{C}-\text{O}$ fenolických $-\text{OH}$ skupin, případně deformačním vibracím $\text{C}-\text{H}$ v methylenových a methylových skupinách. Široký absorpční pás v oblasti $1280\text{--}1200 \text{ cm}^{-1}$ je principiálně přisuzován deformačním vibracím hydroxylových funkčních skupin v karboxylových kyselinách, nebo $\text{C}-\text{O}$ vibracím v aryl etherech. V rozmezí vlnočtů $1170\text{--}950 \text{ cm}^{-1}$ se nachází oblast specifické absorpce alifatických alkoholů ($\text{C}-\text{OH}$), případně $\text{C}-\text{O}$ vazebné vibrace polysacharidů nebo polysacharidům podobných látek [22].

2.3 FLUORESCENČNÍ SPEKTROMETRIE HL A DOM

2.3.1 Ustálená fluorescenční spektrometrie

Ustálená fluorescenční spektrometrie (steady-state) je hojně využívanou technikou při studiu a charakterizaci HL a DOM pocházejících z odlišných přírodních matric [27]. Fluorescenční spektrometrie nám obecně poskytuje nepřeborná množství informací týkajících se struktury, heterogenity, přítomnosti elektron-donorních ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{O}^-$, $-\text{CN}$, $-\text{OCH}_3$ a $-\text{OR}$) a elektron-akceptorních ($-\text{COOH}$ a $-\text{NO}_2$) funkčních skupin, stupně humifikace a “kondenzace” aromatických struktur aj. [28–29].

A (α) – *fulvic-like* a *C* (α) – *humic-like* jsou typickými fluorofory huminových látek (HK a FK) izolovaných z terestriálních přírodních matric, případně některých frakcí DOM. V excitačně-emisních spektrech (EEM) HK pocházejících z kaustobiolitických a půdních matric můžeme nalézt vedlejší fluorescenční maxima (tzv. odvozené *C* – *humic-like* fluorofory), které jsou lokalizovány v oblasti vyšších vlnových délek excitace a emise. Tyto fluorofory jsou mnohými autory pokládány za typická fluorescenční maxima charakterizující HL a DOM. V případě HL, případně vzorků DOM pocházejících z pobřežních a mořských sedimentů můžeme v EEM spektrech lokalizovat specifické fluorescenční maximum, které je v odborných pramenech označováno symbolem *M* (β) – *marine humic-like*. Můžeme se setkat s tvrzením, že toto fluorescenční maximum je prekurzorem fluoroforu *C* (α).

B (γ) – *tyrosin-like* a *T* (δ) – *tryptofan-like* jsou specifickými fluorescenčními maximy DOM pocházejících z přírodních vod, které mají svůj původ v látkách jako je tyrosin a tryptofan. Jedná se o residua doposud nehumifikované organické hmoty, které jsou produkovány na základě mikrobiologické aktivity vodní flóry. Fluorescenční píky *B* (γ) a *T* (δ) jsou typickými fluorofory vzorků přírodních vod [28, 30–31].

Musíme si uvědomit, že poloha jednotlivých fluorescenčních maxim (fluoroforů *A*, *C*, *M*, *B* a *T*) v EEM spektrech je z mnoha pohledů unikátní (tzv. *fingerprint*), na jejichž základě můžeme HL resp. DOM klasifikovat [27, 30, 32–34].

Vlivem IFE prvního a druhého druhu je pozorovaná intenzita fluorescence HL a DOM nižší, než ve skutečnosti je. Tento fakt je bohužel mnohými autory ignorován a přehlížen, a proto se ve svých pracích dopouštějí nepřesné interpretace naměřených dat. Musíme si uvědomit, že IFE ovlivňuje nejen intenzitu fluorescence, ale i polohu fluoroforu, případně může dojít k úplnému vymizení fluorescenčního maxima v EEM spektrech, zvláště pak v tzv. *UV-light* oblasti ($\lambda_{ex,abs} = 200\text{--}350\text{ nm}$) [35]. IFE rovněž nepříznivě ovlivňuje vypočtené hodnoty fluorescenčních indexů, kterými jsou HL a DOM charakterizovány. Vnitřní filtrační efekt musí být zohledněn i v případě měření časově rozlišených fluorescenčních spekter.

Cenné informace o povaze HL a DOM je možné získat z tzv. *fluorescenčních koeficientů*, které jsou definovány jako poměry intenzit fluorescence, případně jako plochy pod křivkou při vhodné zvolených vlnových délkách emise [36–39].

Huminové látky (HK a FK) a některé frakce DOM pocházející z terestriálních přírodních matric jsou principiálně charakterizovány dvěma fluorescenčními maximy *A* (α') a *C* (α). V případě FK jsou tyto fluorofory lokalizovány v oblasti nižších vlnových délek excitace a emise. Fulvinové kyseliny se obvykle vyznačují vyšší intenzitou fluorescence v porovnání s HK. Tyto výsledky naznačují, že FK jsou charakterizovány vyšším obsahem elektron-donorních funkčních skupin, nižší molekulovou hmotností, vyšší molekulární heterogenitou, nižším stupněm humifikace a nižším obsahem aromatických struktur s konjugovaným systémem dvojných vazeb [3, 6, 30, 36, 40]. Podle mnohých autorů [27, 41–43], kteří se zabývali studiem HK izolovaných z kaustobiolitických a půdních matric můžeme v jejich EEM spektrech nalézt minoritní fluorescenční maxima tzv. *C* (α) odvozené *humic-like* fluorofory, které se nacházejí v oblasti vyšších vlnových délek excitace a emise (tj. $\approx 435\text{--}450/500\text{--}540\text{ nm}$). Přítomnost těchto fluoroforů v excitačně-emisních spektrech je typická pro HK, které se vyznačují vysokou molekulovou hmotností, nízkou molekulární heterogenitou, vysokým stupněm humifikace, který je indikátorem vysokého obsahu aromatických jader chinonového typu [27]. *B* (γ) – *tyrosin-like* (270–280/300–315 nm) a *T* (δ) – *tryptofan-like* (270–280/345–360 nm) jsou typickými fluorescenčními maximy DOM pocházejících z přírodních sladkovodních a mořských vod. Kromě těchto fluoroforů můžeme v jejich EEM spektrech nalézt i fluorescenční maxima huminového původu tj. fluorofory *A*, *C* a *M* [28, 30, 44–45]. Musíme mít na zřeteli, že sladkovodní zdroje (řeky a jezera) mohou být kontaminovány opticky zjasňujícími látkami (tzv. *optical brighteners*), které pocházejí z odpadních vod. Jedná se především o deriváty 1,2-difenyloethenu, které mají fluorescenční maxima v oblasti vlnových délek 330–350/410–450 nm. Podle Hendersona a spol. [32] je nezbytně nutné jednotlivé frakce DOM izolovat, aby nedocházelo k nepřesné interpretaci EEM spekter.

Humifikovaná OM představuje jeden z hlavních faktorů řídící fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti půdy a svým množstvím a složením ovlivňuje nejen úrodnost půdy, ale plní i velmi významnou úlohu v půdní hygieně, tj. schopnosti imobilizovat těžké kovy a organické polutanty. Této problematice je věnováno mnoho odborných publikací, které pojednávají o vlivu přídavku OM (kompostu [46], chlévské mrvy [47], odpadního kalu [48] a komunálního odpadu [49]) na vlastnosti HL izolovaných z rozličných půdních matric.

Je obecně známo, že unikátní struktura HL resp. DOM umožňuje vznik komplexů s celou řadou sloučenin, především však s ionty těžkých kovů [50–62]. Musíme si uvědomit, že jednotlivá vazebná místa HL a DOM mají odlišné komplexační vlastnosti. Rozsah a mechanismus komplexace závisí především na pH, iontové síle, povaze kovového iontu, morfologii vazebného místa a v neposlední řadě i na koncentraci ligandu HL. Ionty těžkých kovů jsou v HL vázány především funkčními skupinami, které obsahují volný elektronový pár, případně π vazebné elektrony (karboxylové, fenolické, enolické a aromatické strukturní jednotky). Komplexační kapacitu HL můžeme definovat jako maximální počet specifických míst, které jsou přístupné k navázání kovových iontů [53]. Jak již bylo uvedeno dříve, hodnota pH přímo ovlivňuje míru disociace HL a DOM. Obecně platí, že s rostoucí hodnotou pH ($\approx 3,5$ – $8,5$) se zvyšuje komplexační kapacita HL (tj. sorpční schopnost), avšak při pH > 9 může docházet k hydrolyze již sorbovaných iontů [54]. Velmi dobré review týkající se této problematiky přináší reference [55].

Přechodné kovy Hg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , La^{3+} , Tb^{3+} , UO_2^{2+} , Cr^{4+} mohou efektivně zhaset fluorescenci ligandů HL a DOM, přičemž zhasací efekt Cd^{2+} , Pb^{2+} a Al^{3+} iontů je méně výrazný [56–57]. Je všeobecně známo, že alkalické kovy, případně kovy alkalických zemin nevykazují zhasací účinek. Přechodné kovy mají energetickou d -hladinu níže než excitovaný singletový stav HL a DOM, a proto mohou účinně zhaset fluorescenci těchto ligandů v důsledku intermolekulárního přenosu energie.

2.3.2 Časově rozlišená fluorescenční spektrometrie

Obecně můžeme říci, že časově rozlišená fluorescenční spektrometrie nám poskytuje cenné informace o probíhajících procesech v excitovaných stavech molekul. Tato technika je založena na měření poklesů intenzit emise a anizotropie, kdy na základě těchto naměřených dat můžeme vyhodnotit doby života τ a jejich příslušné relativní amplitudy B . Musíme mít na paměti, že doba života excitovaného stavu τ silně závisí na okolním prostředí, a proto ji můžeme použít k určení fyzikálně-chemických vlastností rozpouštědla (tj. polaritu, pH, teploty, ...). Bohužel, problematice časově rozlišené fluorescence HL a DOM se věnuje jen velmi málo odborných publikací [63–67].

Kumkemu a spol. [65] se podařilo zjistit, že HL pocházející z terestriálních přírodních matric mají tři doby života $\tau_1 < 1$ ns, $\tau_2 \approx 2$ – 5 ns a $\tau_3 \approx 8$ – 14 ns.

Periasama a spol. [68] se ve své práci zabývali interpretací časově rozlišených emisních spekter (TRES) a z nich vypočtených časově rozlišených přes plochu normalizovaných spekter (TRANES) β -naftolu a 2-[2-(4-*N,N*-diethyl-aminofenyl)thiazolo[4,5]chinoxalinu v systémech s odlišnou polaritou okolního prostředí. Autorům se podařilo zjistit, že až na některé výjimky dochází v TRES spektrech k poklesu intenzity fluorescence s rostoucím časem t_k . Tento pokles intenzity fluorescence může způsobit ztrátu pozorovaných změn ve tvaru a průběhu TRES spektra. Tento problém lze s výhodou řešit pomocí časově rozlišených přes plochu normalizovaných spekter (TRANES).

Autoři rovněž rozdělili TRES a TRANES spektra na základě pozorovaných změn v jejich morfologii tzn. tvaru, průběhu, přítomnosti isoemisních bodů aj.

V případě, kdy je pozorováno identické spektrum při všech zvolených časech (0 – t_k) mluvíme o systému *typu A*, ve kterém je přítomen pouze jeden druh fluoroforu resp. emisní jednotky. V TRES spektrech dochází pouze ke kontinuálnímu poklesu intenzity fluorescence a jednotlivé emisní křivky (0 – t_k) jsou v TRANES spektrech totožné.

Pokud v časovém intervalu 0 – t_k dochází ke změně tvaru TRES spekter a v TRANES je identifikován tzv. *isoemisní bod* (tj. vlnová délka, při které se intenzita fluorescence v čase t_k

nemění), mluvíme o systému *typu B*, ve kterém jsou přítomny právě dvě na sobě nezávislé emisní jednotky.

Dále se autorům podařilo zjistit, že v případě emise tří a více na sobě nezávislých emisních jednotek (*typ C*) jsou v časově rozlišených přes plochu normalizovaných spektrech přítomny isoemisní body, jejichž počet je o jednotku menší, než je počet druhů fluoroforů resp. emisních jednotek.

Jestliže dochází v TRES a TRANES spektrech k nepřetržitému posunu emisního maxima v časovém intervalu $0-t_k$, který je obvykle následovaný isoemisním bodem v čase $t > t_k$ mluvíme o fluorescenčním systému *typu D*, který v prvním časovém intervalu indikuje přítomnost kontinua druhů fluoroforu a v intervalu vymezeným časem $t > t_k$ poukazuje na přítomnost dvou na sobě nezávislých emisních jednotek.

Posledním případem diskutovaným v této práci je situace, při které dochází ke kontinuálnímu posunu emisního maxima s časem (*typ E*). Tento typ TRANES spektra poukazuje na přítomnost kontinua druhů fluoroforu.

2.4 ¹³C NMR SPEKTROMETRIE HL A DOM

¹³C spektrometrie nukleární magnetické resonance resp. ¹³C NMR spektrometrie s Fourierovou transformací je považována za základní a nepostradatelnou metodu studia struktury HL a DOM pocházejících z odlišných přírodních matic [69].

¹³C spektrometrie nukleární magnetické resonance nám poskytuje cenné informace o struktuře, chemických a biologických vlastnostech HL a DOM, jejich heterogenitě, přítomnosti a prostorovém uspořádání funkčních skupin, podílu aromatických fragmentů ligninu, sacharidových, peptidových a alifatických jednotek, stupni humifikace a “kondenzace” aromatických struktur aj. [70].

¹³C NMR spektrum HL, případně vzorků DOM můžeme rozdělit na čtyři základní oblasti, které jsou charakteristické pro jednotlivé strukturní jednotky resp. funkční skupiny HL: oblast alifatických atomů uhlíku (0–45 ppm), oblast *O*-alkylových a peptidových atomů uhlíku (45–110 ppm), oblast aromatických a fenolických atomů uhlíku (110–160 ppm) a oblast karboxylových a karbonylových atomů uhlíku (160–200/230 ppm).

Pozice signálů v oblasti 0–45 ppm odpovídá absorpci alkanových uhlíků mastných kyselin a vosků. V ¹³C NMR spektrech HL můžeme nalézt signál v oblasti ≈ 22 ppm, který odpovídá absorpci methylových funkčních skupin. Pozice signálů lokalizovaných v oblasti 20–60 ppm náleží absorpci proteinových struktur HL a DOM. V ¹³C NMR spektrech HL můžeme rovněž nalézt signály v oblastech ≈ 27 , 31 a 40 ppm, které odpovídají absorpci methylenových funkčních skupin v alifatických strukturách HL. V této oblasti ¹³C NMR spektra rovněž absorbují sloučeniny alkylfenolového typu. Pozice signálů v oblasti 60–90 ppm odpovídá absorpci polysacharidových jednotek. Signál lokalizovaný v oblasti ≈ 55 –58 ppm je obvykle připisován methoxy skupinám methylovaných sacharidů v hemicelulózách. V této oblasti ¹³C NMR spektra můžeme rovněž nalézt signály ≈ 56 –62 ppm, které odpovídají absorpci α -uhlíku v aminokyselinách a methylenových funkčních skupin v aromatických strukturách ligninu. Intenzivní signál lokalizovaný v oblasti ≈ 72 ppm je obvykle připisován absorpci C-2, C-3 a C-5 uhlíku v celulóze. V ¹³C NMR spektrech těchto látek můžeme rovněž nalézt signál v oblasti ≈ 105 ppm, který odpovídá absorpci C-1 uhlíku v celulóze. Pozice signálů lokalizovaných v oblasti 95–105 ppm jsou principiálně přisuzovány absorpci anomerních uhlíků v sacharidech. V oblasti ¹³C NMR spektra ohraničeného chemickým posunem 62–80 ppm můžeme nalézt signály, které jsou

připisovány různým alifatickým alkoholům a sacharidům. Aromatické strukturní jednotky HL resp. DOM jsou odvozeny od ligninu, který je tvořen monomerními jednotkami 4-hydroxycinnamylalkoholu, koniferylalkoholu a sinapylalkoholu. V oblasti aromatických a fenolických atomů uhlíku (110–160 ppm) můžeme nalézt tři intenzivní signály při hodnotách chemických posunů ≈ 115 , 130 a 145–150 ppm. Pozice signálu v oblasti ≈ 105 ppm odpovídá absorpci C-2 a C-6 atomů uhlíku v sinapylových tj. syringylových jednotek. V ^{13}C NMR spektrech HL resp. DOM můžeme rovněž nalézt signál v oblasti ≈ 130 ppm, který je obvykle připisován absorpci kvarterních aromatických uhlíků C-1. V této oblasti chemického posunu můžeme identifikovat i absorpci aromatických uhlíků pokud se však nacházejí v poloze *ortho* nebo *para* k O-substituovaným aromatickým uhlíkům. Pozice signálů lokalizovaných v oblasti ≈ 145 –148 ppm jsou obvykle připisovány absorpci C-3 a C-5 uhlíků vázaných β -O-4 vazbou v sinapylalkoholových jednotkách. Rovněž v této oblasti chemického posunu můžeme nalézt absorpci C-3 a C-4 aromatických uhlíků v koniferylalkoholových jednotkách. Pozice signálů v oblasti 165–190 ppm odpovídá absorpci $-\text{COOH}$ resp. $-\text{COO}^-$ funkčních skupin v karboxylových kyselinách. V ^{13}C NMR spektrech HL resp. DOM můžeme rovněž nalézt signál v oblasti ≈ 190 –230 ppm, který je obvykle připisován absorpci karbonylových atomů uhlíku.

Cenné informace o povaze HL resp. DOM je možné získat z tzv. *strukturních parametrů*, které jsou definovány jako poměry intenzit signálů, případně jako plochy pod křivkou při vhodně zvolených chemických posunech [71–77].

3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Disertační práce je zaměřena na studium HL izolovaných z odlišných přírodních matric s ohledem na poznání jejich struktury a reaktivity. Pro studium HL, případně některých frakcí DOM, byly zvoleny především nedestruktivní analytické metody: molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/Vis), infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), ^{13}C spektrometrie nukleární magnetické rezonance (^{13}C NMR liquid state), ustálená (steady-state) a časově rozlišená fluorescenční spektrometrie.

UV/Vis spektra HL resp. DOM patří k nejlépe prostudovaným, a proto budou využity k základní charakterizaci těchto “biokoloidních” sloučenin. K tomuto účelu byly vybrány absorpční koeficienty E_4/E_6 , E_2/E_4 , E_2/E_3 , E_{254}/E_{410} , $\Delta\log K$, $E_{\text{ET}}/E_{\text{Bz}}$ a specifické hodnoty absorbancí A_{280} a $SUVA_{254}$. Dále bude využita infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací, která poskytuje cenné informace o struktuře a povaze HL, jejich reaktivitě, prostorovém uspořádání funkčních skupin, podílu sacharidových a proteinových jednotek atd. V některých případech komplikují interpretaci infračervených spekter HL překrývající se pásy jednotlivých funkčních skupin. Tento problém bude řešen pomocí Fourierovy autodekonvoluce, případně metodou proložení křivky. Stacionární fluorescenční spektrometrie bude v disertační práci využita k identifikaci a lokalizaci jednotlivých fluorescenčních maxim, které nám poskytují komplexní soubor informací týkajících se původu, struktury, heterogenity, přítomnosti některých substituentů uplatňujících elektron-donorní a elektron-akceptorní efekt, stupně humifikace a “kondenzace” aromatických struktur HL a DOM. Po komplexaci HL s vybranými ionty těžkých kovů budou z emisních spekter pomocí Stern-Volmerovy rovnice vypočítány konstanty stability $[\text{HL}-\text{Me}^{\text{X}+}]$ komplexů, jež jsou základním kritériem posouzení sorpčních schopností těchto “biokoloidních” sloučenin. Poprvé je zde použita metoda tzv. časově rozlišených přes plochu normalizovaných fluorescenčních spekter (TRANES), ze kterých lze určit, zda pozorovaná emise HL resp. DOM pochází ze dvou či více emisních jednotek, nebo pouze z jedné. V neposlední řadě bude v této disertační práci použita ^{13}C spektrometrie nukleární magnetické rezonance v kapalně fázi (^{13}C NMR liquid state), která nám poskytuje cenné informace o struktuře, chemických a biologických vlastnostech HL resp. DOM, jejich heterogenitě, přítomnosti reaktivních a biologicky aktivních funkčních skupin (karboxylových, –OH fenolických, aromatických fragmentů ligninu aj.) stupni humifikace a “kondenzace” aromatických stavebních jednotek. Z naměřených ^{13}C NMR spekter budou vypočteny tzv. *strukturní parametry* HL, které jsou nepostradatelnými indikátory aromaticity, biologické aktivity, stupně hydrofilnosti a hydrofobnosti těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 ZDROJE HUMINOVÝCH LÁTEK

Předmětem studia této disertační práce byly HL extrahované z odlišných přírodních matric. Ve většině experimentů byly používány HL izolované z lignitu, půdy, rašeliny a extraktu hnědé mořské řasy. Lignitická HK (JMLHK) byla izolována z jihomoravského lignitu (lokalita důl Mír, Mikulčice u Hodonína, Česká republika). Půdní HL (P1HK, P2HK a PFK) byly extrahovány metodou alkalické extrakce z lesní půdy *Humic Podzol* (lokalita Krkonoše, Česká republika). Zdrojovou matricí rašeliništních HL (JČRHK a JČRFK) byla jihočeská rašelina těžená v povrchovém dolu v Branné, poblíž Třeboně v České republice. AHK byla izolována z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum*, který je znám pod komerčním označením *SWE Acadian*.

Půdní a rašeliništní HL byly izolovány na pracovišti Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích pod odborným vedením Dr. Nováka.

4.1.1 Další zdroje huminových látek

S ohledem na poznání struktury a reaktivity těchto “biokoloidních” sloučenin byly v této disertační práci použity i standardy HL tzn. Leonardite HK, Elliott Soil HL a Pahokee Peat HL. Zdrojovou matricí standardu Leonardite HK (LEOHK) je zoxidované hnědé uhlí (leonardit) těžené v povrchovém dolu Gascoyne, poblíž Bowman County v Severní Dakotě, USA. Standardy půdních HL (ESHK a ESFK) jsou izolovány z úrodné prérijní půdy Elliott Soil (lokalita Joliet, Illinois, USA). Standardy rašeliništních HL (PPHK a PPFK) jsou extrahovány z floridské rašeliny (lokalita NP Everglades, Florida, USA). Tyto vzorky standardů HL byly zakoupeny od Mezinárodní společnosti huminových látek (International Humic Substances Society – IHSS) již ve formě izolovaných preparátů. Bližší informace přináší reference [78].

4.2 IZOLACE HUMINOVÝCH KYSELIN

Lignitická HK byla izolována metodou alkalické extrakce podle Mezinárodní společnosti huminových látek IHSS. Obdobnou metodou alkalické extrakce byly izolovány HK z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum*.

4.3 ELEMENTÁRNÍ ANALÝZA

Elementární složení vzorků HK izolovaných z jihomoravského lignitu a extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* bylo zjištěno pomocí CHNS-O elementárního analyzátoru EA3000. Kalibrace elementárního analyzátoru byla provedena pomocí standardní látky *N*-fenylethanamidu (Acetanilidu). Elementární složení vzorků HK bylo zjištěno pomocí vyhodnocovacího programu *Callidus*TM 5.1.

Elementární analýza půdních a rašeliništních HL byla provedena na pracovišti Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích.

4.4 UV/Vis SPEKTROMETRIE

Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/Vis) je stále běžně používanou technikou při studiu HL, a proto byla použita v této disertační práci k primární charakterizaci těchto “biokoloidních” sloučenin. Na základě provedené literární rešerše byly k tomuto účelu vybrány tyto absorpční koeficienty a specifické absorbance E_4/E_6 , E_2/E_4 , E_2/E_3 ,

E_{254}/E_{410} , $\Delta \log K$, E_{ET}/E_{Bz} , A_{280} a $SUVA_{254}$, které jsou definovány jako poměry absorbancí při vhodně zvolených vlnových délkách, případě jako hodnoty absorpance při různých λ_{Abs} .

4.5 FTIR SPEKTROMETRIE

Infračervená spektrometrie (IR), resp. infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) poskytuje cenné informace o struktuře a povaze HL, jejich reaktivitě, obsahu jednotlivých funkčních skupin, a proto byla využita v této disertační práci k základnímu screeningu těchto “biokoloidních” látek. Jak již bylo diskutováno v kapitole 2.2 při použití “klasické” metody (tj. lisování HL v přítomnosti KBr) může docházet k dekarboxylaci kyselých funkčních skupin, případně jejich deprotonizaci. Z tohoto důvodu byla v této práci použita metoda difuzního odrazu, v odborné literatuře označována jako DRIFTS – *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*. Práškové vzorky HL byly připraveny k měření DRIFT spekter podle následujícího postupu [79]. V oblasti “otisku palce” tzv. fingerprintu ($1500\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) komplikují interpretaci infračervených spekter HL překrývající se pásy jednotlivých funkčních skupin. Tento problém byl v této disertační práci řešen pomocí Fourierovy autodekonvoluce (FSD – Fourier self-deconvolution).

4.6 USTÁLENÁ FLUORESCENČNÍ SPEKTROMETRIE

Podstatná část této disertační práce je věnována studiu HL pomocí ustálené (steady-state) fluorescenční spektrometrie. Hlavní ideou této kapitoly bylo navrhnout a následně provést pilotní experimenty, které by vedly k detailnější charakterizaci těchto “biokoloidních” sloučenin s ohledem na poznání jejich původu resp. geneze, jednotlivých strukturních jednotek, množství substituentů uplatňujících elektron-donorní a elektron-akceptorní efekt, obsahu reaktivních funkčních skupin (–COOH a fenolické –OH), heterogenity, stupně humifikace a “kondenzace” aromatických struktur aj.

Za účelem studia a charakterizace použitých HL pomocí ustálené fluorescenční spektrometrie byly připraveny jejich roztoky o hmotnostní koncentraci $10\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ve standardním fosfátovém pufru (směs $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v poměru 0,61:0,39) o koncentraci $0,05\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a hodnotě pH 7,00–7,18. Takto připravené soly HL byly změřeny na steady-state fluorescenčním spektrometru Horiba FluoroLog[®]. Emisní fluorescenční spektra roztoků HL připravených podle předešlého postupu byla změřena v rozsahu vlnových délek 380–600 nm při konstantní vlnové délce excitačního záření 360 nm. Při měření excitačních spekter těchto “biokoloidních” sloučenin byl emisní monochromátor nastaven na 520 nm. Tyto fluorescenční spektra byla měřena v rozsahu vlnových délek 300–500 nm. Excitačně-emisní fluorescenční spektra (EEM – *Excitation Emission Matrix*) solů HL byla změřena v rozsahu vlnových délek emisní osy 300–600 nm a v rozsahu vlnových délek excitační osy 240–550 nm. Z naměřených experimentálních dat byly vytvořeny matice, ze kterých byly následně vymodelovány konturové mapy (contour maps) vzorků HL pomocí vyhodnocovacího softwaru OriginPro 8.0. Cenné informace o původu, genezi, humifikaci aj. HL je možné získat z tzv. *fluorescenčních koeficientů*, které jsou definovány jako poměry intenzit fluorescence, eventuálně jako plochy pod křivkou při vhodně zvolených vlnových délkách emise, a proto byly použity v této disertační práci k základní charakterizaci těchto “biokoloidních” sloučenin. Na základě provedené literární rešerše byly k tomuto účelu vybrány tyto fluorescenční koeficienty *FI*, *BIX*, *HIX* a v poslední řadě i *Milori index*.

4.6.1 Zhášení fluorescence

Hlavní myšlenkou této kapitoly bylo provést pilotní experimenty zaměřené na proces komplexace ligandů HL s vybranými ionty těžkých kovů. Za účelem studia efektivního zhášení fluorescence s Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} ionty byly zvoleny jako ligandy komplexace půdní HL izolované z úrodné půdy Elliott Soil tj. standardy IHSS ESHL.

V prvním kroku byly připraveny zásobní roztoky HL o hmotnostní koncentraci $30 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ v $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku KOH. Takto připravené soly HL byly zneutralizovány $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztokem HNO_3 . Jak již bylo diskutováno dříve (kapitola 3.3), hodnota pH roztoků HL přímo ovlivňuje míru disociace $\text{Me}^{\text{X}+}$ iontů v nefluoreskujícím komplexu $[\text{HL}-\text{Me}^{\text{X}+}]$, a proto bylo pH těchto zásobních roztoků upraveno $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztokem KOH na finální hodnotu pH 6,35–6,37. Konečná koncentrace HL v zásobním roztoku s definovanou hodnotou pH byla $30 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. V druhém kroku byly připraveny roztoky iontů těžkých kovů $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ v rozmezí molárních koncentrací $0\text{--}350 \text{ } \mu\text{M}$ v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku KNO_3 . Následně byly připraveny roztoky systému $\text{HL}-\text{Me}^{2+}$ o výsledné hmotnostní koncentraci ESHL $15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ a látkové koncentraci iontů těžkých kovů $0\text{--}175 \text{ } \mu\text{M}$. Z naměřených experimentálních dat byly pomocí upravené Stern-Volmerovy rovnice získány parametry komplexace ESHL s Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} ionty.

4.7 ČASOVĚ ROZLIŠENÁ FLUORESCENČNÍ SPEKTROMETRIE

Významná část této disertační práce byla věnována studiu HL pomocí časově rozlišené fluorescenční spektrometrie. Hlavní myšlenkou této kapitoly bylo otestovat a následně zavést nové metody studia HL, které by vedly k detailnějšímu pochopení kvantově-mechanických procesů probíhajících v excitovaných stavech těchto “biokoloidních” sloučenin. K tomuto účelu byla na základě provedené literární rešerše vybrána metoda měření časově rozlišených emisních spekter (TRES – *Time Resolved Emission Spectra*), ze kterých byly následně pomocí normalizace plochy pod křivkou TRES spekter zkonstruovány tzv. časově rozlišené přes plochu normalizované emisní spektra (TRANES – *Time Resolved Area Normalized Emission Spectra*). Rovněž byla v této práci použita metoda dekonvoluce steady-state emisních spekter pomocí zjištěných relativních zastoupení příslušných dob života (τ_i) při daných vlnových délkách. Takto bylo steady-state fluorescenční spektrum studovaných HL rozděleno na jednotlivá spektra přítomných emisních jednotek resp. druhů. Za účelem studia HL pomocí časově rozlišené fluorescenční spektrometrie byly připraveny jejich roztoky o hmotnostní koncentraci $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ve standardním fosfátovém pufru o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a hodnotě pH 7,00–7,10. Takto připravené soly HL byly změřeny na časově rozlišeném fluorescenčním spektrometru Horiba FluoroCube[®] pracujícím na základě metody TCSPC.

4.8 ¹³C SPEKTROMETRIE NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÉ RESONANCE

Závěrečná část této disertační práce je věnována studiu a charakterizaci HL pomocí ¹³C NMR spektrometrie v roztoku. Tato technika je rovněž označována v odborné literatuře jako *liquid state* resp. ¹³C NMR LS. V této kapitole si klademe za cíl navrhnout a následně provést pilotní experimenty, které by vedly k podrobnějšímu poznání struktury, chemických a biologických vlastností těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin.

Za tímto účelem byly připraveny roztoky HL o koncentraci $50\text{--}100 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku NaOD v D_2O . Takto připravené soly HL byly změřeny na ¹³C NMR spektrometru Bruker[®] Avance III 500 MHz s pracovní frekvencí 125,77 MHz, počtem akumulací na jedno spektrum

25 000, délkou excitačního pulsu 10,5 μ s, akvizičním časem 0,52 s a s relaxační dobou mezi jednotlivými skeny 2,00 s. Pro potlačení nežádoucích deformací základní linie ^{13}C NMR spekter HL byla použita metoda pulsní sekvence “ZRSEGPIG”.

Na základě provedené literární rešerše byly ^{13}C NMR spektra HL integrovány v oblasti alifatických atomů uhlíku (0–45 ppm), *O*-alkylových a peptidových atomů uhlíku (45–106 ppm), aromatických a fenolických atomů uhlíku (106–165 ppm) a v oblasti karboxylových a karbonylových atomů ^{13}C (165–220 ppm).

Dále byly HL použité v této disertační práci charakterizovány pomocí tzv. *strukturních parametrů*, které jsou definovány jako poměry intenzit signálů, případně jako plochy pod křivkou při vhodně zvolených chemických posunech.

5 DISKUZE NEJVÝZNAMNĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ

5.1 ELEMENTÁRNÍ A DOC ANALÝZA HUMINOVÝCH LÁTEK

S ohledem na publikované strukturní vzorce huminových látek, ať už jsme stoupenci “historického” polymerního nebo supramolekulárního vyjádření jejich struktury, musí být naše pozornost v případě elementární analýzy fokusována na obsah biogenních prvků tj. uhlíku, vodíku, dusíku, síry a v neposlední řadě i kyslíku, vzhledem k tomu, že tyto elementy tvoří majoritní část skeletu těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin.

Veškeré HL použité v této disertační práci byly podrobeny základní charakterizaci pomocí elementární a Dissolved Organic Carbon – DOC analýzy. Naměřené výsledky elementárního složení, množství rozpuštěného organického uhlíku DOC a termogravimetrické analýzy určující obsah popela a celkové vlhkosti jsou uvedeny v Tab. 1.

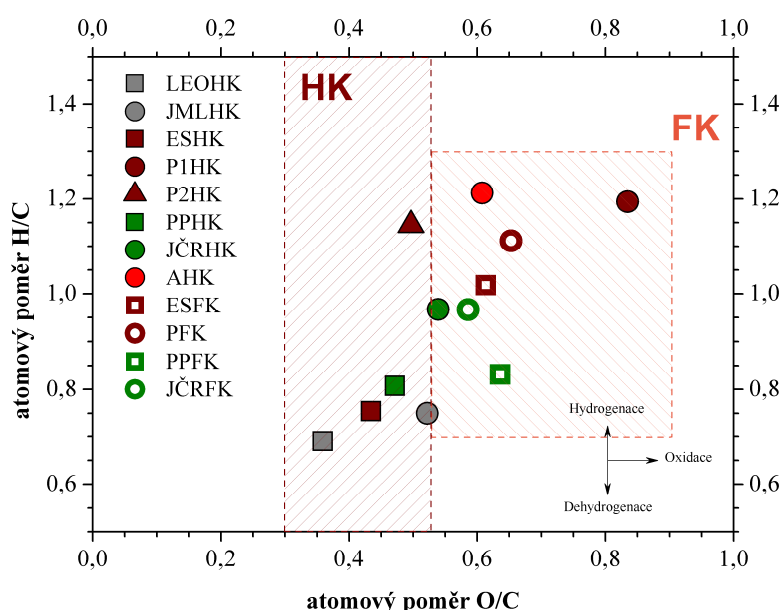
Tab. 1: Elementární složení použitých HL (elementární složení vzorků HL jsou uvedena v *atom. %* a vztažena na suchý vzorek bez popela), obsah popela, celkové vlhkosti a rozpuštěného organického uhlíku DOC

vzorek HL	elementární složení v atom. %					DOC (mg·g _{HL} ⁻¹)	vlhkost (hm. %)	popel (hm. %)
	C	H	N	S	O			
LEOHK	48,29	33,37	0,80	0,22	17,33	(–)	7,91	2,13
JMLHK	43,73	32,79	0,65	(–)	22,83	748	7,21	3,62
ESHK	44,40	33,49	2,71	0,13	19,27	(–)	6,20	0,99
P1HK	32,07	38,29	2,56	(–)	26,77	532	5,02	17,19
P2HK	37,44	42,86	1,11	(–)	18,59	612	5,61	1,37
PPHK	42,74	34,51	2,40	0,20	20,15	(–)	6,95	1,03
JČRHK	39,31	38,01	1,36	0,13	21,19	780	5,89	4,78
AHK	34,99	42,42	1,33	(–)	21,26	636	6,10	0,28
ESFK	37,01	37,66	2,37	0,25	22,71	(–)	7,57	3,71
PFK	35,98	39,99	0,54	(–)	23,49	656	7,58	5,95
PPFK	39,74	33,04	1,73	0,22	25,27	(–)	8,42	6,53
JČRPFK	38,74	37,44	0,90	0,22	22,69	627	6,39	3,85

Výsledky z elementární analýzy ukazují, že použité HL jsou převážně tvořeny uhlíkem, vodíkem, kyslíkem a minoritně dusíkem a sírou. Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 1, použité vzorky vykazují typické prvkové složení HL izolovaných z terestriálních přírodních matric. V obecném pohledu na dosažené výsledky elementárního složení HL můžeme konstatovat, že HK vyjma vzorků izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK a P2HK) a extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) obsahují v porovnání s FK více organického uhlíku a jeho rozpustné formy DOC. Naproti tomu byly FK použité v této disertační práci charakterizovány vyšším obsahem vodíku a kyslíku s výjimkou již zmiňovaných půdních a mořských HK. Elementární analýza půdních HL (P1HK, P2HK a PFK) ukázala, že tyto vzorky jsou tvořeny nižším obsahem uhlíku, dusíku a síry v porovnání se standardy půdních HL ESHK a ESFK. V neposlední řadě byly tyto “biokoloidní” sloučeniny s výjimkou vzorku izolovaného z lesní půdy

Humic Podzol (P2HK) charakterizovány vyšším obsahem kyslíku oproti standardům půdních HL ESHK a ESFK, které byly v této kapitole disertační práce použity především jako referenční materiál. Obdobných závěrů bylo dosaženo i v případě HL izolovaných z jihočeské rašeliny. Kvantitativní prvková analýza HK izolované z jihomoravského lignitu (JMLHK) ukázala, že tento vzorek je tvořen nižším obsahem uhlíku, vodíku, dusíku a síry, ale zároveň vyšším obsahem kyslíku vzhledem ke standardu LEOHK. V případě vzorku HK izolované z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) elementární analýza odhalila, že tento vzorek obsahuje poměrně nízké množství uhlíku, kdežto obsah vodíku byl druhou nejvyšší hodnotou z celého souboru studovaných HL. Množství dusíku a kyslíku bylo srovnatelné s rašeliništní HK pocházející z jihočeské rašeliny (JČRHK).

Z naměřených hodnot elementárních složení HL byly vypočteny atomové poměry H/C, O/C a N/C. Z vypočtených hodnot atomových poměrů H/C a O/C byl sestrojen *van Krevelenův* diagram na jehož základě mohou být klasifikovány tyto “biokoloidní” sloučeniny. Van Krevelenův diagram použitých vzorků HL je uveden na Obr. 1.



Obr. 1: van Krevelenův diagram použitých vzorků HL

Jak je patrné z Obr. 1, půdní HL (P1HK, P2HK a PFK) vykazují vyšší míru hydrogenace a oxidace v porovnání se standardy ESHK a ESFK. Obdobných výsledků bylo dosaženo i v případě HL izolovaných z jihočeské rašeliny. Pozice rašeliništních HL (JČRHK a JČRHK) ve *van Kreveleného diagramu* odhalila, že tyto vzorky jsou silněji substituovány alifatickými a v případě vzorku JČRHK i polárními funkčními skupinami v porovnání s jejími příslušnými standardy (PPHK a PPFK). V porovnání s použitým standardem PPFK bylo zjištěno, že vzorek FK izolovaný z jihočeské rašeliny (JČRHK) obsahuje nižší množství kyslík obsahující funkčních skupin tj. karboxylové, –OH fenolické a v neposlední řadě i –OCH₃ methoxylové funkční skupiny. Poloha lignitické HK (JMLHK) ve *van Kreveleného diagramu* vypovídá o vyšším stupni oxidace a hydrogenace skeletu této “biokoloidní” sloučeniny vzhledem k použitému standardu LEOHK. Jak je z Obr. 10 zřejmé, HK izolovaná z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) byla charakterizována nejvyšší hodnotou atomového poměru H/C, jež dává tušit značnou míru hydrogenace této “biokoloidní” sloučeniny. Hodnota atomového poměru O/C byla v tomto případě shodná se standardem půdní FK (ESFK).

5.2 UV/Vis SPEKTROMETRIE HUMINOVÝCH LÁTEK

Veškeré HL použité v této disertační práci byly podrobeny základnímu screeningu pomocí UV/Vis spektrometrie. Jednou z primárních a časově nenáročných metod, jak mohou být HL charakterizovány je měření jejich absorpčních spekter, ze kterých byly následně vypočítány zmiňované UV/Vis charakteristiky. Vypočtené absorpční koeficienty E_4/E_6 , E_2/E_4 , E_2/E_3 , E_{254}/E_{410} , $\Delta \log K$, E_{ET}/E_{Bz} a hodnoty specifických absorbancí A_{280} a $SUVA_{254}$ jsou sumarizovány v Tab. 2.

Tab. 2: Vypočtené hodnoty absorpčních koeficientů a specifických hodnot absorbancí použitých HL

vzorek HL	absorpční koeficienty						specifické absorbance	
	E_{ET}/E_{Bz} (–)	E_4/E_6 (–)	E_2/E_4 (–)	$\Delta \log K$ (–)	E_2/E_3 (–)	E_{254}/E_{410} (–)	A_{280} (–)	$SUVA_{254}$ ($g_{HL} \cdot mg^{-1} \cdot m^{-1}$)
LEOHK	0,84	4,74	5,86	0,66	2,58	3,95	0,36	8,58
JMLHK	0,86	6,54	6,03	0,74	2,65	3,99	0,42	9,21
ESHK	0,83	3,49	4,49	0,52	2,33	3,32	0,25	7,72
P1HK	0,76	5,72	5,79	0,58	3,27	4,77	0,11	3,26
P2HK	0,48	8,86	10,35	0,94	3,61	6,25	0,13	3,95
PPHK	0,79	5,31	6,43	0,71	2,79	4,32	0,28	7,55
JČRHK	0,68	8,60	8,70	0,90	3,16	5,36	0,17	5,28
AHK	0,73	6,51	4,92	0,74	2,44	3,37	0,09	2,10
ESFK	0,67	12,83	19,21	1,11	4,96	10,25	0,18	5,45
PFK	0,55	12,21	14,53	1,11	3,75	7,49	0,13	4,32
PPFK	0,74	10,31	13,68	0,98	4,26	7,97	0,21	5,80
JČRPFK	0,65	16,47	20,06	1,31	4,33	9,61	0,13	4,61

Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 2, použité vzorky vykazují typické hodnoty absorpčních koeficientů a specifických hodnot absorbancí HL izolovaných z terestriálních a kaustobiolitických přírodních matric. Z globálního hlediska můžeme konstatovat, že HK, vyjma vzorků izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (P2HK) a jihočeské rašeliny (JČRHK), jsou v porovnání s FK charakterizovány vyšší mírou substituce aromatických struktur polárními funkčními skupinami. Naproti tomu byly FK použité v této disertační práci charakterizovány nižšími hodnotami E_{ET}/E_{Bz} , a proto se můžeme domnívat, že tyto vzorky jsou tvořeny vyšším stupněm substituce aromatických struktur hydrofobními skupinami. Vypočtené hodnoty absorpčního koeficientu E_{ET}/E_{Bz} půdních HL (P1HK, P2HK a PFK) dávají tušit přítomnost aromatických sloučenin, které jsou více substituovány alifatickými funkčními skupinami v porovnání s jejich půdními standardy *Elliott Soil*. Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 2, podobných závěrů bylo dosaženo i v případě HL izolovaných z jihočeské rašeliny. Nejvyšší hodnoty absorpčního koeficientu E_{ET}/E_{Bz} z celého souboru studovaných HL vykazovaly HK izolované z jihomoravského lignitu (JMLHK) a *Leonarditu* (LEOHK). UV/Vis analýza odhalila, že HK izolovaná z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) se vyznačuje srovnatelnou mírou a typem substituce aromatických struktur jako již dříve diskutovaný standard FK *Pahokee Peat*.

Z naměřených UV/Vis spekter HL byly vypočteny absorpční koeficienty E_4/E_6 , E_2/E_4 , $\Delta \log K$, E_2/E_3 a E_{254}/E_{410} , jejichž hodnoty jsou dobrými ukazateli molekulové hmotnosti a aromaticity těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin. Jak je zřejmé z výsledků uvedených v Tab. 2, studované vzorky vykazují obvyklé hodnoty absorpčních koeficientů HL izolovaných z hnědouhelných, půdních a rašeliništních přírodních matric. V širším pohledu na prezentované výsledky absorpčních koeficientů E_4/E_6 , E_2/E_4 , $\Delta \log K$, E_2/E_3 a v neposlední řadě i E_{254}/E_{410} můžeme říci, že HK jsou v porovnání s FK charakterizovány vyšší molekulovou hmotností a stupněm aromaticity. Naproti tomu byly půdní a rašeliništní FK charakterizovány nesporně vyššími hodnotami těchto absorpčních koeficientů, které v sobě nesou informace o molekulové hmotnosti, aromaticitě a stupni humifikace. Vypočtené hodnoty absorpčních koeficientů půdních HK (P1HK a P2HK) naznačují, že tyto vzorky jsou v porovnání se svým standardem ESHK charakterizovány nižší molekulovou hmotností, stupněm humifikace a aromaticitou. Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 2, FK izolovaná z lesní půdy *Humic Podzol* se vyznačovala nižšími hodnotami absorpčních poměrů E_4/E_6 , E_2/E_4 , E_2/E_3 a E_{254}/E_{410} , a proto můžeme říci, že tato FK je oproti svému standardu ESFK charakterizována vyšší molekulovou hmotností, stupněm humifikace a aromaticitou. Obdobných závěrů bylo dosaženo i v případě HL izolovaných z jihočeské rašeliny. Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 2, HK izolovaná z jihomoravského lignitu (JMLHK) se v porovnání se svým standardem LEOHK vyznačovala vyššími hodnotami absorpčních indexů E_4/E_6 , E_2/E_4 , $\Delta \log K$, E_2/E_3 a E_{254}/E_{410} , a proto můžeme říci, že tento vzorek je charakterizován nižším stupněm humifikace. Tyto hodnoty absorpčních koeficientů rovněž svědčí o nižší molekulové hmotnosti této “biokoloidní” sloučeniny. Kromě toho si nelze nepovšimnout, že HK izolovaná z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) se vyznačovala srovnatelnými hodnotami použitých koeficientů v porovnání s výše diskutovaným vzorkem JMLHK. V případě vzorku AHK jsou vypočtené hodnoty těchto koeficientů spíše ukazateli střední molekulové hmotnosti \overline{M}_w nežli stupně aromaticity, jak vyplývá ze specifických hodnot absorbancí a indexu f_a , který byl vypočten na základě naměřeného ^{13}C NMR spektra.

Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 2, použité vzorky vykazují typické hodnoty specifických absorbancí HL pocházejících z terestriálních přírodních matric. Z globálního hlediska můžeme konstatovat, že použité standardy HL, s výjimkou HK izolované z oxidovaného lignitu, jsou v porovnání s ostatními HL charakterizovány vyšším stupněm aromaticity. Hodnoty specifických absorbancí půdních HL tzn. P1HK, P2HK a PFK vypovídají o nižším obsahu aromatických jader, které jsou v tomto případě přisuzovány mono- a poly-substituovaným kyselinám a fenolům. Naproti tomu byly standardy půdních HL charakterizovány vyšším podílem výše zmíněných aromátů. Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 2, obdobných závěrů bylo dosaženo i v případě HL izolovaných z jihočeské rašeliny. Naproti tomu, HK izolovaná z jihomoravského lignitu se oproti standardu LEOHK vyznačovala vyššími hodnotami specifických absorbancí. Kromě toho, je na tomto místě nutné konstatovat, že stanovené hodnoty A_{280} a $SUVA_{254}$ byly v případě výše uvedeného vzorku JMLHK nominálně nejvyšší. Kromě toho, si v Tab. 2 nelze nepovšimnout skutečnosti, že HK pocházející z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) byla charakterizována nejnižšími hodnotami specifických absorbancí. Z výše uvedeného faktu, se lze tedy domnívat, že tato HK je převážně tvořena alifatickými strukturními jednotkami O- a N- alkylového typu, které jsou ukazateli látek, kam zpravidla řadíme mastné kyseliny, vosky, proteiny a v neposlední řadě i polysacharidy.

5.3 FTIR SPEKTROMETRIE HUMINOVÝCH LÁTEK

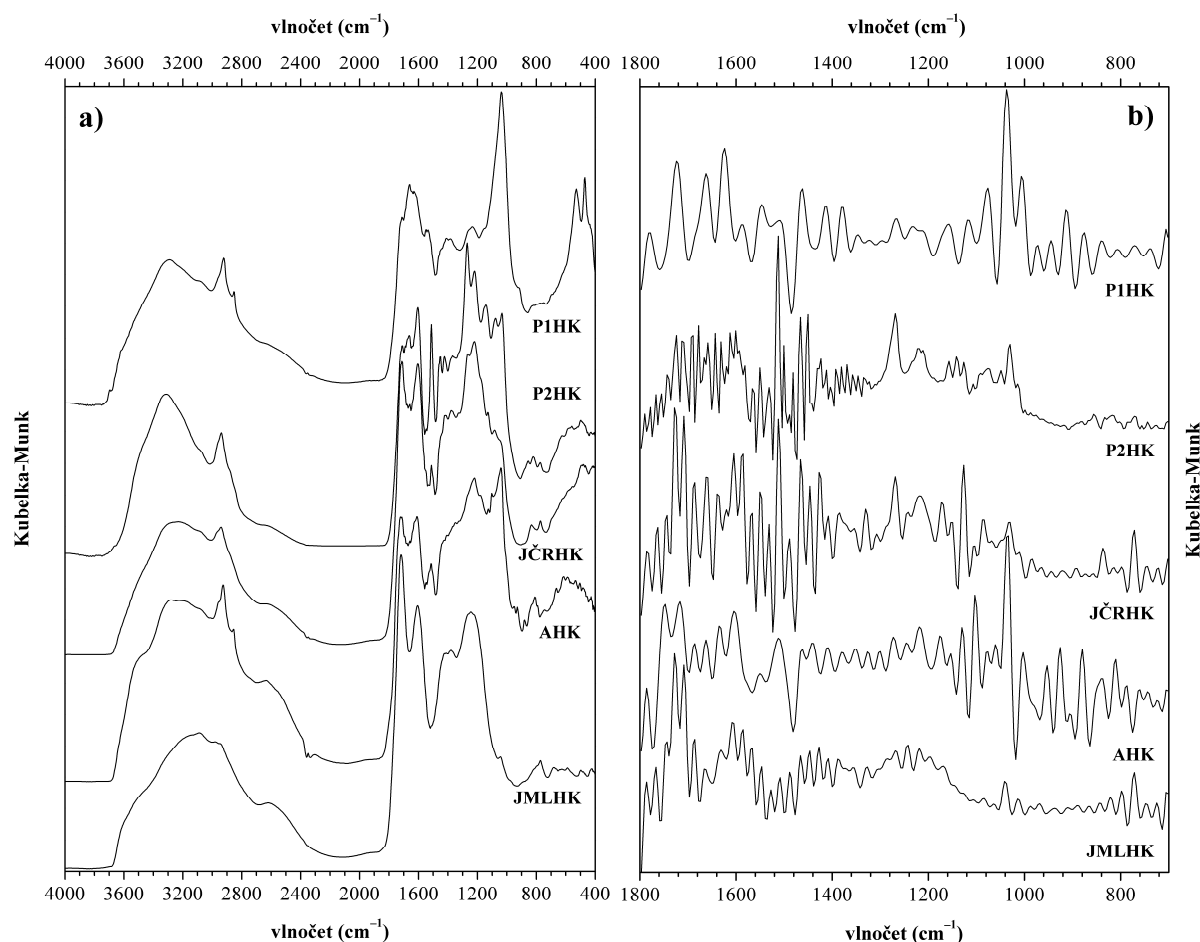
Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), resp. její metoda difuzního odrazu, která je v odborné literatuře známa pod zkratkou DRIFTS – *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy* byla v této disertační práci použita k základnímu screeningu tzn. identifikaci funkčních skupin a strukturních jednotek tvořící skelet těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin. Z naměřených DRIFTS spekter použitých vzorků bylo zřejmé, že v oblasti “otisku palce” tzv. fingerprintu ($\approx 1500\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) znesnadňují interpretaci infračervených spekter HL překrývající se absorpční pásy jednotlivých funkčních skupin. Tato překážka byla v této disertační práci vyřešena pomocí Fourierovy autodekonvoluce (FSD – Fourier self-deconvolution).

Na Obr. 2a jsou uvedena typická FTIR-DRIFTS spektra HK izolovaných z terestriálních a nižších rostlinných (autotrofních) přírodních matric. Široký absorpční pás v oblasti $3316\text{--}3137\text{ cm}^{-1}$ odpovídá valenčním vibracím O–H a N–H skupin v karboxylových kyselinách, fenolech, alifatických alkoholech, amidech, etherech, ..., aj. Hydroxylové funkční skupiny velmi ochotně tvoří v HL vodíkové můstky a poskytují tak velmi široký pás, který obvykle znesnadňuje identifikaci valenčních vibrací C–H skupin v aromatických strukturách těchto “biokoloidních” sloučenin. Vyjma vzorku JMLHK byly v jejich DRIFTS spektrech lokalizovány absorpční pásy v oblastech $2941\text{--}2922\text{ cm}^{-1}$ a $2856\text{--}2852\text{ cm}^{-1}$ připadající asymetrickým a symetrickým valenčním vibracím C–H vazeb methylenových funkčních skupin. Naproti tomu, byl v DRIFTS spektru vzorku HK izolované z jihomoravského lignitu (JMLHK) identifikován dublet odpovídající asymetrické valenční vibraci C–H vazeb methylových funkčních skupin, jejichž specifická absorpce je vymezena oblastí $2970\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$. Absorpční pás při 1452 cm^{-1} připadající deformačním vibracím --CH_3 a $\text{--CH}_2\text{--}$ skupin byl pozorován pouze u vzorku HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P2HK). S výjimkou vzorku P2HK a AHK byl v jejich DRIFTS spektrech lokalizován absorpční pás v oblasti vlnočtů $1382\text{--}1378\text{ cm}^{-1}$ odpovídající symetrické deformační vibraci C–H vazeb v methylových skupinách nebo symetrické valenční vibraci karboxylového anionu (COO^-). Přítomnost tohoto pásu a absence signálu v oblasti valenčních vibrací methylových funkčních skupin v případě všech vzorků HK vyjma již zmiňovaného preparátu JMLHK indikuje přítomnost elektronegativního atomu např. kyslíku v této funkční skupině. V případě vzorků HK izolovaných z jihomoravského lignitu (JMLHK) a extraktu hnědé mořské řasy *Ascomyllum nodosum* (AHK) bylo v jejich DRIFTS spektrech identifikováno nevýrazné absorpční maximum v oblasti $3086\text{--}3010\text{ cm}^{-1}$ připadající symetrické valenční vibraci C–H skupin v aromátech. Přítomnost aromatických strukturních jednotek byla rovněž potvrzena absorpčními pásy, jejichž pozice byly lokalizovány v oblastech vlnočtů $1606\text{--}1601\text{ cm}^{-1}$ a $1514\text{--}1510\text{ cm}^{-1}$ připadající valenčním skeletálním (dýchací) vibracím ...C=C=C... vazeb v aromatickém kruhu. Tyto absorpční pásy byly identifikovány u všech vzorků vyjma HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK). Absorpční pás lokalizovaný při $\approx 1510\text{ cm}^{-1}$ s největší pravděpodobností indikátorem ligninu nebo z ligninu odvozených strukturních jednotek. Jak je patrné z Obr. 2a, intenzita tohoto absorpčního pásu klesala v pořadí $\text{P2HK} > \text{AHK} > \text{JČRHK} > \text{JMLHK}$. Ostrý absorpční pás v oblasti $1719\text{--}1710\text{ cm}^{-1}$ odpovídá symetrické valenční vibraci C=O skupin v karboxylových kyselinách. Ve všech DRIFTS spektrech vzorků HK byly lokalizovány méně či více intenzivní absorpční pásy v oblasti vlnočtů $\approx 1680\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ připadající symetrickým valenčním vibracím karbonylových funkčních skupin v chinonech, případně konjugovaných ketonech. Absorpční pás při 1630 cm^{-1} připadající symetrické valenční vibraci C=O skupin v sekundárních amidech byl pozorován pouze u vzorku HK pocházející z lesní půdy *Humic Podzol*

(P1HK). Vyjma vzorku JMLHK byl v jejich DRIFTS spektrech identifikován absorpční pás v oblasti $1548\text{--}1532\text{ cm}^{-1}$, který je tradičně připisován valenční vibraci C–N a deformační vibraci N–H vazeb v sekundárních amidech. Jak je z Obr. 2a zřejmé, s výjimkou vzorku P1HK a AHK byl v jejich infračervených spektrech lokalizován méně výrazný absorpční pás v oblasti $1423\text{--}1416\text{ cm}^{-1}$ odpovídající symetrické valenční vibraci karboxylového anionu (COO^-). Rovněž byl v DRIFTS spektrech vyjma vzorků HK izolovaných z jihočeské rašeliny (JČRHK) a lesní půdy *Humic Podzol* (P2HK) identifikován absorpční pás při $\approx 1410\text{ cm}^{-1}$ připadající deformační vibraci O–H vazeb fenolických –OH skupin. V případě vzorku HK izolované z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* bylo v jejím infračerveném spektru identifikováno nevýrazné absorpční maximum při 1348 cm^{-1} , které je obvykle přisuzováno deformační asymetrické vibraci C–H vazeb methylových funkčních skupin. Pouze u vzorků P2HK, JČRHK a JMLHK byl v jejich IR spektrech identifikován absorpční pás odpovídající asymetrické vibraci C–O–C vazeb v aryl etherech, jejichž specifická absorpce je vymezena oblastí $1269\text{--}1244\text{ cm}^{-1}$. S výjimkou HK izolované z jihomoravského lignitu (JMLHK) byl v jejich FTIR-DRIFTS spektrech lokalizován poměrně intenzivní a široký absorpční pás, který je tradičně připisován valenční asymetrické vibraci C–O a deformační vibraci O–H vazeb v karboxylových a fenolických –OH skupinách, jejichž vlnčet specifické absorpce je dán rozmezím $1233\text{--}1220\text{ cm}^{-1}$. Absorpční pás při $1180\text{--}1142\text{ cm}^{-1}$ připadající valenční asymetrické vibraci C–O–C vazeb v alkyl-etherech byl pozorován pouze u vzorků HK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (P2HK) a extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK). Vyjma vzorků JMLHK a P1HK byly v jejich infračervených spektrech lokalizovány méně či více intenzivní absorpční pásy v oblasti $1129\text{--}1077\text{ cm}^{-1}$, které jsou zpravidla přisuzovány valenční asymetrické vibraci C–O–C a valenční symetrické vibraci C–O vazeb v alifatických etherech a sekundárních alkoholech. S výjimkou vzorku HK pocházející z jihočeské rašeliny byl v jejich DRIFTS spektrech identifikován absorpční pás odpovídající valenční symetrické vibraci C–O a valenční vibraci Si–O vazeb v primárních alkoholech, polysacharidech a silikátech, jejichž specifická absorpce je vymezena oblastí $1044\text{--}1033\text{ cm}^{-1}$. Široký a intenzivní absorpční pás při 1037 cm^{-1} připadající valenční vibraci Si–O vazeb v kaolinitu byl pozorován pouze u vzorku HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK). Jak je z Obr. 2a zřejmé, na silnou mineralizaci vzorku P1HK anorganickými sloučeninami poukazují i další absorpční pásy, které byly lokalizovány v oblastech vlnčetů $3800\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$, $796\text{--}775\text{ cm}^{-1}$ a v neposlední řadě i $529\text{--}471\text{ cm}^{-1}$. Méně intenzivní absorpční pás při 3696 cm^{-1} je obvykle připisován valenční vibraci O–H vazeb v kaolinitu. Přítomnost anorganických příměsí byla rovněž potvrzena méně či více výraznými absorpčními pásy, jejichž pozice byly lokalizovány v oblastech vlnčetů $796\text{--}775\text{ cm}^{-1}$ a $529\text{--}471\text{ cm}^{-1}$ připadající valenční vibraci Si–O, deformační vibraci Si–O–Al a Si–O–Si vazeb v kaolinitu, montmorillonitu, křemenu eventuálně jeho amorfni modifikaci. Tyto výsledky nejsou nikterak překvapivé s ohledem na již zjištěný obsah popela, který byl v případě tohoto vzorku nejvyšší.

Jak již bylo řečeno v úvodním odstavci této kapitoly, z naměřených FTIR-DRIFTS spekter použitých vzorků bylo zjevné, že v oblasti tzv. *fingerprintu* znesnadňují interpretaci infračervených spekter HL překrývající se absorpční pásy jednotlivých funkčních skupin. Tato nesnáze byla v této disertační práci řešena pomocí Fourierovy autodekonvoluce, která je v odborné literatuře známa pod zkratkou FSD – *Fourier self-deconvolution*. Pomocí Fourierovy autodekonvoluce byly získány “nové” absorpční pásy, které nebyly v naměřených DRIFTS spektrech vzorků HL doposud pozorovány, případně se jevily pouze jako nevýrazná raménka bez zjevného maxima, kterým nebylo možné přiřadit hodnotu daného vlnčetu.

Na Obr. 2b jsou uvedena FSD-DRIFTS spektra HK izolovaných z jihomoravského lignitu, lesní půdy *Humic Podzol*, jihočeské rašeliny a extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum*.



Obr. 2: **a)** FTIR-DRIFTS spektra HK izolovaných z terestriálních a nižších rostlinných přírodních matric; **b)** jejich FSD-DRIFTS spektra

Vyjma vzorku P1HK byl v jejich FSD-DRIFTS spektrech lokalizován poměrně intenzivní absorpční pás v oblasti $1748\text{--}1742\text{ cm}^{-1}$ odpovídající valenční symetrické vibraci $\text{C}=\text{O}$ skupin alifatických esterů karboxylových kyselin. Přítomnost alifatických esterů byla rovněž potvrzena absorpčním pásem, jehož pozice byla lokalizována v oblasti vlností $1197\text{--}1158\text{ cm}^{-1}$ připadající valenční vibraci $\text{C}-\text{O}$ vazeb v alkyl-esterech. Jak je z Obr. 2b zřejmé, na přítomnost aromatických esterů ve studovaných HK poukazují absorpční pásy, které byly lokalizovány v oblastech vlností $1732\text{--}1723\text{ cm}^{-1}$, $1307\text{--}1266\text{ cm}^{-1}$ a $1130\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$. Ostrý a intenzivní absorpční pás při $1732\text{--}1723\text{ cm}^{-1}$ je tradičně připisován valenční symetrické vibraci karbonylové skupiny v aryl-esterech. Méně či více intenzivní absorpční pásy lokalizované v oblasti “klasického” otisku palce tzn. při $1307\text{--}1266\text{ cm}^{-1}$ a $1130\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ odpovídají valenční vibraci $\text{Ar}-\text{C}-\text{O}$ a $\text{O}-\text{C}-\text{C}$ vazeb v aromatických esterech. Ostrý absorpční pás v oblasti $1597\text{--}1586\text{ cm}^{-1}$ náleží valenční asymetrické vibraci $\text{C}=\text{O}$ skupin v karboxylovém anionu COO^- . Ve všech FSD-DRIFTS spektrech vzorků HK byl lokalizován méně intenzivní absorpční pás v oblasti vlností $1099\text{--}1086\text{ cm}^{-1}$, který je obvykle připisován rovinné deformační vibraci $\text{C}-\text{H}$ vazeb v aromátech. S výjimkou vzorku HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK) si v jejich infračervených FSD spektrech nelze nepovšimnout tří charakteristických absorpčních pásů, které se nacházejí v oblastech vlností $880\text{--}867\text{ cm}^{-1}$, $819\text{--}813\text{ cm}^{-1}$ a v neposlední řadě i $748\text{--}744\text{ cm}^{-1}$. Absorpční pás při $880\text{--}867\text{ cm}^{-1}$ odpovídá mimorovinné deformační vibraci $\text{C}-\text{H}$ vazeb v *meta*-substituovaných

aromatických sloučeninách odvozených od ligninu tzn. koniferylalkoholu a sinapylalkoholu. Naproti tomu, absorpční pás lokalizovaný v oblasti $819\text{--}813\text{ cm}^{-1}$ je tradičně připisován mimorovinným deformacím aromatických C–H vazeb v *para*-substituovaných sloučeninách. V případě HK resp. HL se může jednat o strukturní jednotky odvozených od 4-hydroxycannamylalkoholu. Jak je z Obr. 2b zřejmé, z těchto absorpčních pásů byl identifikován jako nejintenzivnější signál, který je z pravidla přičítán mimorovinné deformační vibraci C–H vazeb v *ortho*-substituovaných aromatických sloučeninách, jehož specifická absorpce se nachází v oblasti $748\text{--}744\text{ cm}^{-1}$. Rovněž je nutné podotknout, že po aplikaci Fourierovy autodekonvoluce se absorpční pásy lokalizované v oblasti $1680\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ nacházely při stejných vlnočtech, avšak jejich intenzita byla nesrovnatelně vyšší v porovnání s původními DRIFTS spektry. To vše může přispět k lepší lokalizaci a následné identifikaci absorpčních pásů, které odpovídají specifickým vibracím jednotlivých funkčních skupin. Ve všech FSD-DRIFTS spektrech vzorků HK byly identifikovány intenzitně proměnlivé absorpční pásy, které jsou výhradně připisovány valenčním vibracím C–N a deformačním vibracím N–H vazeb v sekundárních amidech, jejichž specifická absorpce je vymezena oblastí $1573\text{--}1565\text{ cm}^{-1}$ a $1557\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$. Jak je z Obr. 2b zřejmé, na přítomnost alifatických funkčních skupin ve studovaných HK poukazují absorpční pásy, které byly lokalizovány v oblastech vlnočtů $1491\text{--}1483\text{ cm}^{-1}$, $1472\text{--}1465\text{ cm}^{-1}$ a $1458\text{--}1443\text{ cm}^{-1}$. Ostrý avšak méně intenzivní absorpční pás při $1491\text{--}1483\text{ cm}^{-1}$ je obvykle připisován deformační vibraci methylenových funkčních skupin. Naproti tomu, o přítomnosti koncových --CH_3 skupin ve studovaných HK svědčí poměrně intenzivní absorpční pás, který odpovídá deformační vibraci C–H vazeb v methylových skupinách, jehož specifická absorpce je vytyčena vlnočty $1472\text{--}1465\text{ cm}^{-1}$. V případě absorpčního pásu lokalizovaného v oblasti $1458\text{--}1443\text{ cm}^{-1}$ nejsme schopni rozlišit, zda pozorovaná absorpce pochází z deformačních vibrací $\text{--CH}_2\text{--}$ nebo --CH_3 alifatických funkčních skupin. Na přítomnost delších nebo rozvětvených alifatických řetězců, vyjma vzorku HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK), poukazuje absorpční pás, který byl lokalizován při $720 \pm 2\text{ cm}^{-1}$. Přítomnost tohoto absorpčního pásu v infračerveném spektru je typická pro sloučeniny (alkany) stávající se ze čtyř a více methylenových skupin. Absence absorpčního pásu při 720 cm^{-1} v FSD-DRIFTS spektru P1HK je s největší pravděpodobností způsobena silnou mineralizací HK anorganickými sloučeninami (montmorillonit, případně křemen v krystalické a amorfní modifikaci), které mají v této části IR spektra svoji specifickou absorpci. Ve všech FSD-DRIFTS spektrech vzorků HK byly identifikovány intenzitně proměnlivé absorpční pásy, které jsou obvykle připisovány deformačním vibracím C–H vazeb v methylových skupinách, jejichž specifická absorpce je vymezena oblastí $1356\text{--}1346\text{ cm}^{-1}$ a $1330\text{--}1323\text{ cm}^{-1}$. Také je nutné podotknout, že tyto absorpční pásy odpovídající deformačním vibracím v --CH-- skupinách mají v IR spektrech nejčastěji podobu dubletu, jestliže však nejsou maskovány intenzivnějšími absorpčními pásy solí karboxylových kyselin tj. karboxylátů (COO^-). Na výskyt delších resp. rozvětvených alifatických řetězců s výjimkou vzorků HK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK a P2HK) poukazuje absorpční pás při $1069\text{--}1060\text{ cm}^{-1}$, který je tradičně pokládán za indikátor skeletálních vibrací C–C vazeb v alifatických skupinách. Absorpční pás při $1176\text{--}1170\text{ cm}^{-1}$ můžeme připsat nejen asymetrické valenční vibraci C–O–C vazeb v alkyl-etherech, ale i valenční vibraci C–O vazeb ve fenolických --OH skupinách. Rovněž je nutné říci, že po aplikaci Fourierovy autodekonvoluce byly ve všech FSD spektrech lokalizovány poměrně intenzivní absorpční pásy v oblastech vlnočtů $1129\text{--}1116\text{ cm}^{-1}$, $\approx 1090\text{ cm}^{-1}$, $1110\text{--}1104\text{ cm}^{-1}$ a v neposlední řadě i $1085\text{--}1075\text{ cm}^{-1}$, které jsou tradičně přisuzovány valenční asymetrické vibraci C–O–C a valenční symetrické vibraci C–O vazeb v alifatických etherech a sekundárních alkoholech. Jak již bylo diskutováno výše, v této části IR spektra přispívají svojí absorpcí i aromatické estery

a aromáty, a proto musí být tyto sloučeniny brány v úvahu. V případě HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK) nelze ani vyloučit, že poměrně výrazný absorpční pás při 1117 cm^{-1} odpovídá valenční vibraci Si–O vazeb v křemeni, kaolinitu anebo montmorillonitu s ohledem na vysoký obsah popela v tomto analyzovaném vzorku. Jak je z Obr. 2b patrné, i v tomto případě se po aplikaci Fourierovy autodekonvoluce absorpční pásy lokalizované v oblastech $1063\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$, $1040\text{--}1030\text{ cm}^{-1}$, $987\text{--}980\text{ cm}^{-1}$, $975\text{--}961\text{ cm}^{-1}$ a $945\text{--}942\text{ cm}^{-1}$ nacházely při totožných vlnočtech, nicméně jejich intenzita byla mnohem vyšší v porovnání s původními difuzními IR spektry. To vše nepochybně přispělo k lepší identifikaci a do značné míry i interpretaci absorpčních pásů, které v sobě skrývají informace o specifických absorpcích jednotlivých funkčních skupin. Tyto absorpční pásy lokalizované v FSD spektrech jsou obvykle připisovány valenční symetrické vibraci C–O a valenční vibraci Si–O vazeb v primárních alkoholech, polysacharidech a jílových minerálech tzn. kaolinitech a montmorillonitech. Absorpční pás při $1013\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ odpovídá s největší pravděpodobností rovinné deformační vibraci C–H vazeb v aromatických sloučeninách.

Obdobných výsledků bylo dosaženo i v případě standardů HK a mimo jiné i vzorků FK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol*, jihočeské rašeliny a jejich odpovídajících standardů *Elliott Soil* a *Pahokee Peat*.

5.4 FLUORESCENČNÍ SPEKTROMETRIE HUMINOVÝCH LÁTEK

V posledních několika letech se ustálená fluorescenční spektrometrie (*steady-state*) stala v oblasti studia a charakterizace HL resp. DOM jistým standardem, který nám poskytuje mnoho cenných informací o těchto unikátních “biokoloidních” sloučeninách. Jak je z profilace této disertační práce zřejmé, jednou z hlavních myšlenek bylo navrhnout a následně provést pilotní experimenty, které by vedly k detailnější charakterizaci použitých HL s ohledem na poznání jejich původu resp. geneze, jednotlivých strukturních jednotek, množství substituentů uplatňujících elektron-donorní a elektron-akceptorní efekt, obsahu reaktivních funkčních skupin (–COOH a v neposlední řadě i fenolické –OH), “molekulární” heterogenity, stupně humifikace a “kondenzace” aromatických struktur aj. Fluorescenční spektrometrie v ustáleném stavu (*steady-state*) představuje vhodnou instrumentální techniku ke studiu a charakterizaci HL izolovaných z terestriálních, kaustobiolitických, sladkovodních, přímořských a “biologických” přírodních matric.

5.4.1 Excitační a emisní spektra huminových látek

Veškeré HL použité v této disertační práci byly podrobeny základní charakterizaci pomocí ustálené fluorescenční spektrometrie. Jednou ze základních a časově nenáročných metod, jak mohou být HL charakterizovány je měření jejich emisních a excitačních fluorescenčních spekter. Po korekci IFE prvního a druhého druhu byly z naměřených fluorescenčních spekter HL odečteny polohy fluorescenčních maxim s příslušnými hodnotami intenzit fluorescence $I_{F(\text{max.})}$, které jsou v této kapitole uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Stanovené polohy fluorescenčních maxim a jejich příslušných intenzit fluorescence $I_{F(max.)}$ v emisních a excitačních spektrech použitých HL

vzorek HL	excitační spektrum		emisní spektrum	
	$\lambda_{ex(max.)}$ (nm)	$I_F(max.)$ (CPS) $\times 10^6$	$\lambda_{em(max.)}$ (nm)	$I_F(max.)$ (CPS) $\times 10^6$
LEOHK	434	2,26	507	2,52
JMLHK	432	3,57	523	4,28
ESHK	435	2,39	540	3,03
P1HK	452	2,35	518	2,50
P2HK	360–400	(–)	469	0,99
PPHK	431	1,84	533	2,25
JČRHK	431	2,48	508	3,21
AHK	373	0,22	525	0,21
ESFK	(–)	(–)	461	4,56
PFK	(–)	(–)	460	2,34
PPFK	(–)	(–)	474	4,73
JČRFK	(–)	(–)	463	6,21

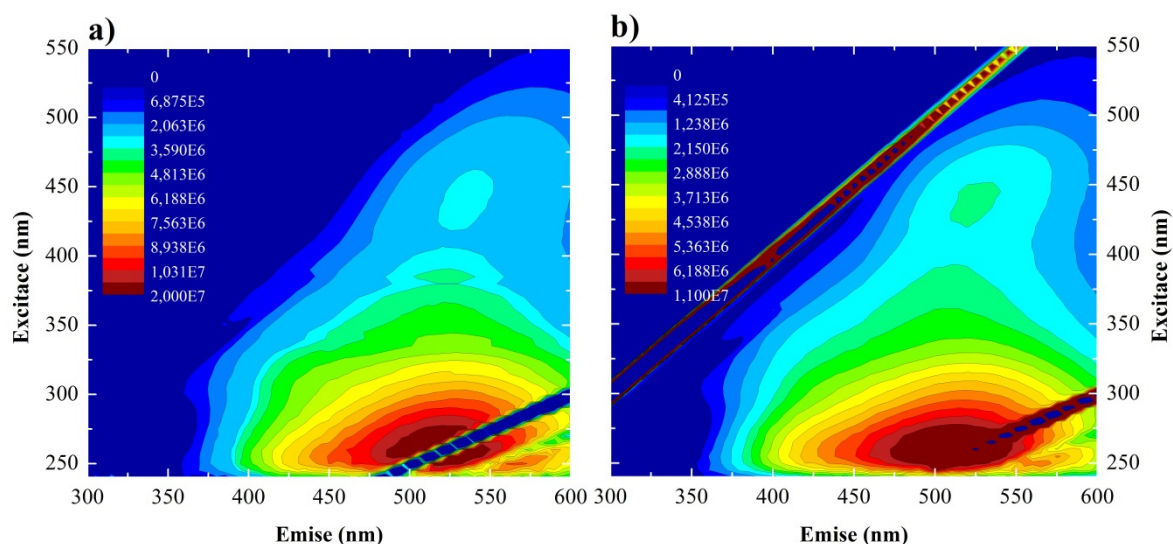
Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 3, studované vzorky vykazují typické fluorescenční maxima HL izolovaných z terestriálních a kaustobiolitických přírodních matric. Vyjma vzorků FK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol*, jihočeské rašeliny a jejich standardů *Elliott Soil* a *Pahokee Peat* byly v jejich excitačních spektrech lokalizovány intenzitně proměnlivá fluorescenční maxima v oblasti vlnových délek 373–452 nm, které jsou zpravidla přisuzovány píkům, které mají svůj původ v tzv. α – *humic-like* fluoroforech. Tyto fluorofory jsou mnohými autory pokládány za indikátory molekulové hmotnosti, stupně humifikace a “kondenzace” aromatických struktur HK pocházejících z terestriálních a kaustobiolitických přírodních matric. Absence fluorescenčního maxima α – *humic-like* v excitačních spektrech FK je pravděpodobně způsobena nižším obsahem aromatických struktur s konjugovaným systémem dvojných vazeb. Vyjma vzorků HK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK a P2HK) a extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) bylo v jejich excitačních spektrech lokalizováno fluorescenční maximum, které se nacházelo téměř při shodné vlnové délce tzn. $\lambda_{ex(max.)} \approx 433 \pm 2$ nm.

S výjimkou vzorku izolovaného z lesní půdy *Humic Podzol* (P2HK) jsou veškeré HK v porovnání s FK charakterizovány fluorescenčními maximy, které byly lokalizovány v oblasti vyšších vlnových délek při $\lambda_{em(max.)} \approx 507$ –540 nm. Naproti tomu byly FK použité v této disertační práci vyjma vzorku PFK charakterizovány vyššími hodnotami intenzity fluorescence, nicméně jejich fluorescenční maxima byla lokalizována v oblasti nižších vlnových délek emisního záření. Emisní fluorescenční spektrometrie půdních HL (P1HK, P2HK a PFK) ukázala, že tyto vzorky jsou tvořeny nižším obsahem aromatických jader s elektron-donorními substituenty v porovnání se standardy půdních HL (ESHK a ESFK). Kromě toho musíme mít na zřeteli, že nižší intenzita fluorescence je spjata s vyšším obsahem elektron-akceptorních funkčních skupin –COOH, avšak nemůžeme ani vyloučit vliv molekulové hmotnosti HL. V neposlední řadě byly standardy HL izolované z úrodné půdy *Elliott Soil* charakterizovány vyšším obsahem karbonylových,

hydroxylových, alkoxylových a aminových funkčních skupin, které obecně na aromátech uplatňují elektron-donorní efekt, vyšším stupněm humifikace a “kondenzace” aromatického jádra. Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 3, vzorky rašeliništních HL byly charakterizovány intenzivními fluorescenčními maximy, jejichž pozice byly lokalizovány v oblasti nižších vlnových délek v porovnání s jejich příslušnými standardy HL (PPHK a PPFK). Emisní fluorescenční spektrometrie uhelných HK odhalila, že vzorek izolovaný z jihomoravského lignitu (JMLHK) je oproti standardu LEOHK tvořen vyšším obsahem aromatických strukturních jednotek substituovaných elektron-donorními funkčními skupinami a v neposlední řadě i alifatickými řetězci s konjugovaným systémem dvojných vazeb. HK izolovaná z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* byla charakterizována nejnižší hodnotou intenzity fluorescence, avšak její fluorescenční maximum se nacházelo v oblasti vlnových délek srovnatelných s HK pocházejících z terestriálních a kaustobiolitických přírodních matric. Kromě toho je na tomto místě nutné říci, že interpretovat výsledky pouze na základě emisního spektra AHK by bylo v tomto případě silně zavádějící s ohledem na průběh excitačního spektra, které dává tušit přítomnost intenzivnějších fluorescenčních maxim v krajních oblastech budícího záření tzn. $\lambda_{\text{ex (max.)}} \approx 240\text{--}350\text{ nm}$ a $450\text{--}600\text{ nm}$.

5.4.2 Excitačně-emisní spektra huminových látek

Na Obr. 3 jsou uvedena typická excitačně-emisní fluorescenční spektra (EEM) HK izolované z jihomoravského lignitu (JMLHK) a jejího příslušného standardu *Leonardite* (LEOHK). V excitačně-emisních spektrech HK izolovaných z jihomoravského lignitu a oxidovaného hnědého uhlí *Leonardite* byly lokalizovány dvě fluorescenční maxima v oblasti vlnových délek $\approx 250\text{--}265/505\text{--}510\text{ nm}$ a $\approx 440/525\text{--}535\text{ nm}$ ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$), které jsou obvykle připisovány fluoroforům A (α) – *fulvic-like* a odvozených C (α) – *humic-like*. Tyto fluorescenční píky jsou mnohými autory pokládány za typická fluorescenční maxima HL izolovaných z terestriálních přírodních matric. V případě vzorku JMLHK byly tyto fluorofory lokalizovány v oblasti vyšších vlnových délek excitace a emise tzn. při $\approx 265/510\text{ nm}$ a $\approx 440/535\text{ nm}$, a proto se můžeme domnívat, že sloučeniny zodpovědné za tuto fluorescenci jsou silněji substituovány elektron-donorními skupinami --NH_2 , --OH , C=O a --OR . Mimo jiné si v EEM spektru HK izolované z jihomoravského lignitu nelze nepovšimnout dalších fluorescenčních maxim, které se nacházely v oblasti vlnových délek $\approx 255/450\text{ nm}$ a $\approx 385/520\text{ nm}$. Poměrně intenzivní fluorescenční pík lokalizovaný v oblasti $\approx 255/450\text{ nm}$ je zpravidla prisuzován A (α) – *fulvic-like* fluoroforům. Méně intenzivní fluorescenční pík při $\approx 385/520\text{ nm}$ ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$) je obvykle připisován C (α) – *humic-like* fluoroforům, ze kterých jsou odvozeny fluorescenční maxima, jejichž polohy se nacházejí v oblasti vyšších vlnových délek excitace. Na základě těchto výsledků můžeme říci, že HK izolovaná z jihomoravského lignitu je v porovnání se standardem LEOHK charakterizována vyšší “molekulární” heterogenitou, nižší molekulovou hmotností, nižším stupněm humifikace a “kondenzace” aromatických jader.

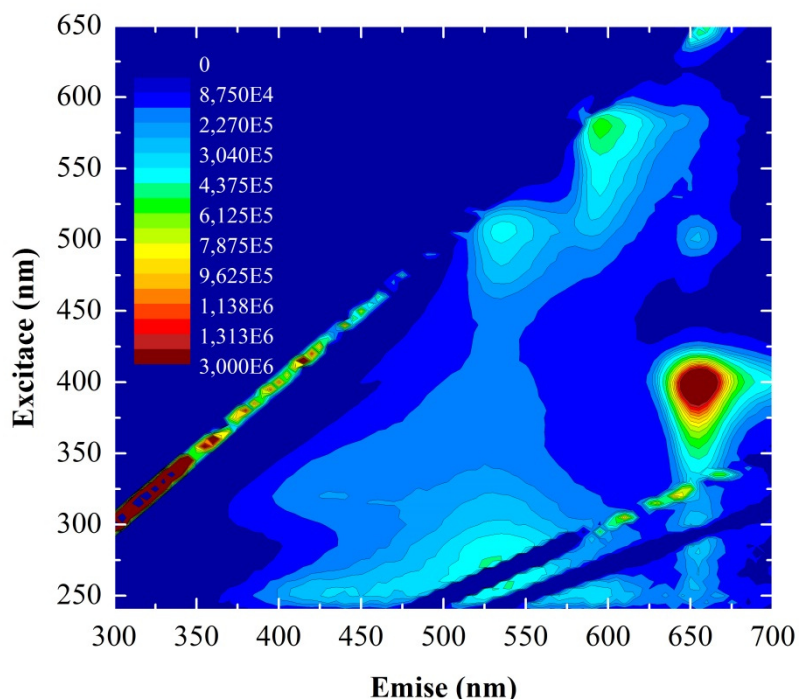


Obr. 3: Excitačně-emisní spektra uhelných HK; a) HK izolovaná z jihomoravského lignitu; b) standard HK *Leonardite*

Obdobných výsledků bylo dosaženo i v případě HK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol*, jihočeské rašeliny a jejich odpovídajících standardů *Elliott Soil* a *Pahokee Peat*. Mimo jiné byla v případě vzorku P2HK v jeho EEM spektru identifikována relativně intenzivní fluorescenční maxima v oblasti vlnových délek $\approx 280/345\text{--}365\text{ nm}$, která jsou zpravidla připisována fluoroforům $T(\delta)$ – *tryptofan-like*. Fluorofory $T(\delta)$ jsou produkovány na základě biologické aktivity půdních mikroorganismů, z nichž nejvýznamnějšími zástupci jsou půdní bakterie rodu *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, aktinomycety rodu *Streptomyces* a v neposlední řadě i mikromycety, houby a řasy.

Excitačně-emisní fluorescenční spektrum HK izolované z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) je prezentováno na Obr. 4. Z porovnání EEM spektra AHK s HK izolovanými z terestriálních přírodních matric je zřejmé, že tento vzorek obsahuje nejen fluorofory typické pro přímořské HL, ale i fluorescenční maxima, která jsou výhradně připisována tzv. *algae pigmentům*. V excitačně-emisním spektru HK izolované z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) byla identifikována tři typická fluorescenční maxima v oblasti vlnových délek $\approx 255\text{--}270/435\text{--}525\text{ nm}$ ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$), které jsou tradičně připisována $A(\alpha)$ – *fulvic-like* fluoroforům, z nichž nejintenzivnější fluorescenční pík byl lokalizován v oblasti vyšších vlnových délek excitace a emise tzn. při $\approx 270/525\text{ nm}$. Z výše uvedené polohy fluorescenčního maxima při $\approx 270/525\text{ nm}$ lze usuzovat, že tento fluorofor je v porovnání s ostatními $A(\alpha)$ charakterizován vyšším obsahem aromatických struktur substituovaných funkčními skupinami – NH_2 , $\text{C}=\text{O}$, $-\text{OH}$ a v neposlední řadě i $-\text{OR}$. Kromě toho si v EEM spektru vzorku AHK nelze nepovšimnout méně intenzivního fluorescenčního maxima identifikovaného v oblasti vlnových délek $\approx 315/425\text{ nm}$ ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$), které je zpravidla přisuzováno $M(\beta)$ – *marine humic-like* fluoroforům. Tento fluorescenční pík je mnohými autory pokládán za typické fluorescenční maximum HK izolovaných z pobřežních a mořských sedimentů. Fluorescenční pík $M(\beta)$ může být za jistých okolností považován za prekurzor terestriálních fluoroforů $C(\alpha)$ – *humic-like*. O přítomnosti fragmentů doposud nehumifikované organické hmoty (OM) tzn. *algae pigmentů* ve vzorku HK izolované z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* svědčí fluorescenční píky, které se nacházely v oblasti vysokých vlnových délek excitace a emise tj. při $\approx 400\text{--}580/535\text{--}655\text{ nm}$. V excitačně-emisním spektru AHK byla lokalizována intenzitně proměnlivá fluorescenční maxima v oblasti vlnových délek $\approx 400/655\text{ nm}$ a $500/655\text{ nm}$ ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$), která můžou být připsána sloučeninám, jako jsou *chlorofyly*. Toto specifické fluorescenční maximum výhradně

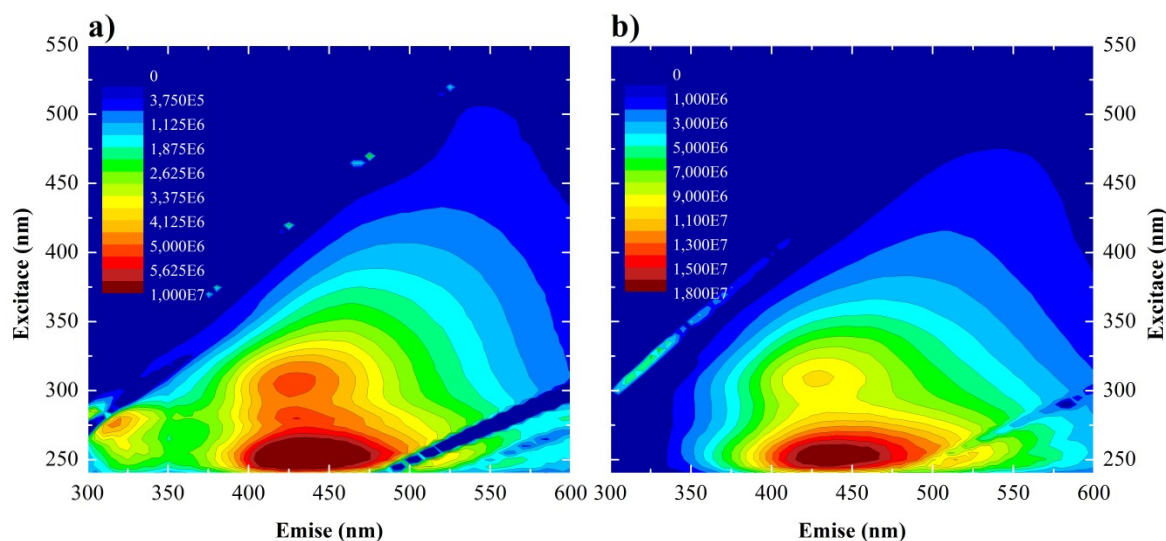
markerem *chlorofylu typu a*, který je majoritně zastoupen v chloroplastech mořských řas řádu *Fucales*. Kromě toho si v EEM spektru AHK nelze nepovšimnout relativně intenzivních fluorescenčních maxim, která byla lokalizována v oblasti nižších vlnových délek emise tzn. při $\approx 505/535$ nm a $\approx 580/595$ nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$), která jsou v tomto případě připisována *algae pigmentům* červené barvy jako je *fytoerytrin*, jehož typickým chromoforem je *phycoerythrobilin*. Závěrem můžeme říci, že HK izolovaná z extraktu hnědé mořské řasy řádu *Fucales* obsahuje sloučeniny nehuminového charakteru, které způsobují výraznou fluorescenci tohoto vzorku. Z výše uvedeného faktu lze usuzovat, že tzv. *algae pigmenty* přispívají k celkové fluorescenci AHK a fluorofory *marine humic-like* identifikované v oblasti $\approx 315/425$ nm mohou být odpovědné za fluorescenci terestriálních HL.



Obr. 4: Excitačně-emisní spektrum HK izolované z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum*

Na Obr. 5 jsou uvedena EEM spektra FK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* a jejího příslušného standardu *Elliott Soil*. Z porovnání naměřených EEM spekter vzorků FK je zřejmé, že excitačně-emisní spektra půdních FK obsahují intenzivní fluorescenční maxima, která jsou charakteristická pro HL pocházející z terestriálních přírodních matric. V excitačně-emisních spektrech studovaných FK byla lokalizována dvě dominantní fluorescenční maxima v oblasti vlnových délek $\approx 250/430$ nm a $\approx 305\text{--}310/425\text{--}430$ nm ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$), která jsou i v tomto případě přisuzována *A* (α) – *fulvic-like* a *C* (α) – *humic-like* fluoroforům. Z výše prezentovaných poloh fluorescenčních píků v EEM spektrech použitých FK lze usuzovat, že tyto fluorofory jsou tvořeny obdobným počtem aromatických struktur substituovaných elektron-donorními skupinami. Naproti tomu, nižší intenzita fluorescence FK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* svědčí o vyšší molekulové hmotnosti tohoto vzorku. Tyto výsledky jsou v dobré shodě s hodnotami absorpčních koeficientů, které jsou ukazateli molekulové hmotnosti HL. Pouze u vzorku PFK byla identifikována minoritní fluorescenční maxima v oblasti vlnových délek $\approx 280/320\text{--}360$ nm, která jsou tradičně připisována *T* (δ) – *tryptofan-like* fluoroforům. Z porovnání naměřených EEM spekter studovaných FK je zřejmé, že půdní FK je oproti standardu ESFK charakterizována vyšším počtem fluorescenčních píků, které odpovídají *A* (α) – *fulvic-like* fluoroforům. Z výše uvedené

skutečnosti lze usuzovat na vyšší “molekulární” heterogenitu tohoto vzorku izolovaného z lesní půdy *Humic Podzol*.



Obr. 5: Excitačně-emisní spektra půdních FK; **a)** FK izolovaná z lesní půdy *Humic Podzol*; **b)** standard FK *Elliott Soil*

Obdobných výsledků bylo dosaženo i v případě FK izolované z jihočeské rašeliny a jejího odpovídajícího standardu *Pahokee Peat*.

5.4.3 Fluorescenční koeficienty

Fluorescenční spektrometrie v ustáleném stavu byla v této kapitole použita k získání tzv. *fluorescenčních koeficientů*, jejichž vypočtené hodnoty jsou dobrými ukazateli původu a stupně humifikace těchto “*biokoloidních*” sloučenin. Veškeré HL použité v této disertační práci byly podrobeny základní charakterizaci pomocí výše uvedených koeficientů. Vypočtené hodnoty fluorescenčních indexů jsou sumarizovány v Tab. 4.

Tab. 4: Vypočtené hodnoty fluorescenčních koeficientů studovaných HL (*FI* – fluorescenční index, *BIX* – biologický/autochtonní index, A_{440} – Milori index a *HIX* – humifikační index)

vzorek HL	<i>FI</i> (–)	<i>BIX</i> (–)	$A_{440} \times 10^8$ (CPS)	<i>HIX</i> (–)
LEOHK	0,73	0,43	2,75	34,28
JMLHK	0,67	0,35	4,62	37,49
ESHK	0,65	0,35	3,38	21,48
P1HK	0,57	0,40	3,21	11,35
P2HK	0,90	0,75	0,58	1,94
PPHK	0,67	0,33	2,41	20,76
JČRHK	0,73	0,42	2,03	10,18
AHK	0,80	0,62	0,24	1,17
ESFK	1,03	0,49	1,99	16,42
PFK	1,06	0,56	0,88	2,23
PPFK	0,86	0,35	3,02	38,26
JČRFK	1,00	0,39	1,99	7,94

Vypočtené hodnoty fluorescenčních koeficientů *FI* a *BIX* naznačují, že HL použité v této disertační práci jsou převážně terestriálního a alochtonního původu. Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 4, studované vzorky vykazují typické hodnoty fluorescenčního a biologického/autochtonního indexu HL izolovaných z rozličných půd a lignitů různého stupně oxidace. V obecném pohledu na dosažené výsledky fluorescenčního indexu HL můžeme říci, že HK vyjma vzorků izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* (P2HK) a extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* obsahují v porovnání s FK nízké množství sloučenin autochtonního původu. Naproti tomu byly FK použité v této disertační práci charakterizovány vyšším obsahem autochtonních sloučenin, které jsou ukazateli mikrobiální dekompozice organické hmoty během humifikačního procesu. Hodnoty fluorescenčního indexu *BIX* půdních HL (P1HK, P2HK a PFK) ukázaly, že tyto vzorky jsou tvořeny vyšším obsahem autochtonních sloučenin v porovnání s jejich půdními standardy *Elliott Soil* (ESHK a ESFK). Tyto výsledky naznačují, že dekompozice organické hmoty v průběhu humifikačního procesu HL izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* byla silněji ovlivněna mikrobiální činností autotrofních bakterií. Rovněž můžeme konstatovat, že podobných závěrů bylo dosaženo i v případě HL izolovaných z jihočeské rašeliny. Fluorescenční analýza HK izolované z jihomoravského lignitu (JMLHK) ukázala, že tento vzorek je tvořen nižším obsahem sloučenin autochtonního původu v porovnání s jeho standardem LEOHK. Přítomnost stopového množství autochtonních sloučenin v uhelných HL není nikterak znepokojující, jestliže si uvědomíme, že jmenovateli rané fáze prouhelnění nekromasy jsou mikrobiální činnosti aerobních a anaerobních bakterií. V případě vzorku HK izolované z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) je zřejmé, že vysoké hodnoty fluorescenčních koeficientů *FI* a *BIX* nejsou ukazateli autochtonního původu, nýbrž zdroje biologického.

Z naměřených emisních spekter HL byly vypočteny fluorescenční koeficienty A_{440} a *HIX*, jejichž hodnoty jsou dobrými ukazateli aromaticity a stupně humifikace těchto unikátních

“biokoloidních” sloučenin. Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 4, studované vzorky vykazují obvyklé hodnoty fluorescenčních koeficientů HL izolovaných z uhelných, rašeliništních a půdních přírodních matric. V širším pohledu na prezentované výsledky humifikačního indexu *HIX* a Milori indexu A_{440} můžeme říci, že HL vyjma vzorku HK izolované z jihomoravského lignitu (JMLHK) jsou v porovnání se svými standardy (ESHK, ESFK, PPHK a PPFK) charakterizovány nižším stupněm humifikace a aromaticity. Naproti tomu byly standardy HL charakterizovány vyššími hodnotami těchto fluorescenčních indexů, které v sobě odrážejí informace o podílu aromatických struktur a tedy i míry humifikace těchto “biokoloidních” sloučenin. Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 4, HL izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK, P2HK a v neposlední řadě i PFK) vykazují nižší obsah aromatických struktur, a proto můžeme konstatovat, že tyto půdní HL jsou charakterizovány nižším stupněm humifikace v porovnání se standardy ESHK a ESFK. Tentýž výsledek bylo dosaženo i v případě HL izolovaných z jihočeské rašeliny. Hodnoty fluorescenčních indexů $A_{440} \approx 4,62$ a $HIX \approx 37,49$ lignitické HK vypovídají o vyšším stupni humifikace respektive aromaticitě této “biokoloidní” sloučeniny vzhledem k použitému standardu LEOHK. Jak je zřejmé z výsledků uvedených v Tab. 4, HK izolovaná z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) byla charakterizována nejnižšími hodnotami fluorescenčních koeficientů A_{440} a *HIX*, a proto se můžeme domnívat, že tento vzorek HK je v porovnání s ostatními HL tvořen nízkým obsahem aromatických struktur a tudíž i nízkým stupněm humifikace.

5.4.4 Statické zhášení fluorescence ligandů HL s Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} ionty

Za účelem studia reaktivity HL, které jsou zde reprezentovány konstantami stability komplexů $[\text{HL}-\text{Me}^{X+}]$ a částmi počáteční fluorescence, které jsou schopny podlehnout statickému zhášení s Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} ionty byly jako ligandy komplexace zvoleny standardy půdních HL (ESHK a ESFK). Z naměřených experimentálních dat byly pomocí upravené Stern-Volmerovy rovnice vypočteny konstanty stability K_a $[\text{Me}^{2+}]$ a parametry f_a ligandů půdních HL po komplexaci s Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} ionty. Tyto výsledky zhášení fluorescence půdních HL s vybranými ionty těžkých kovů jsou sumarizovány v Tab. 5.

Tab. 5: Vypočtené hodnoty konstanty stability v logaritmickém vyjádření $\log K_a$ $[\text{Me}^{2+}]$ a parametr f_a , který odpovídá části počáteční fluorescence, která je schopna podlehnout statickému zhášení s Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} ionty.

vzorek HL		$\log K_a$	f_a (%)	R^2
ESHK	Cu^{2+}	4,85	90	0,99
	Pb^{2+}	4,50	69	0,99
	Hg^{2+}	5,15	89	0,98
ESFK	Cu^{2+}	4,45	69	1,00
	Pb^{2+}	3,70	59	0,99
	Hg^{2+}	(–)	(–)	(–)

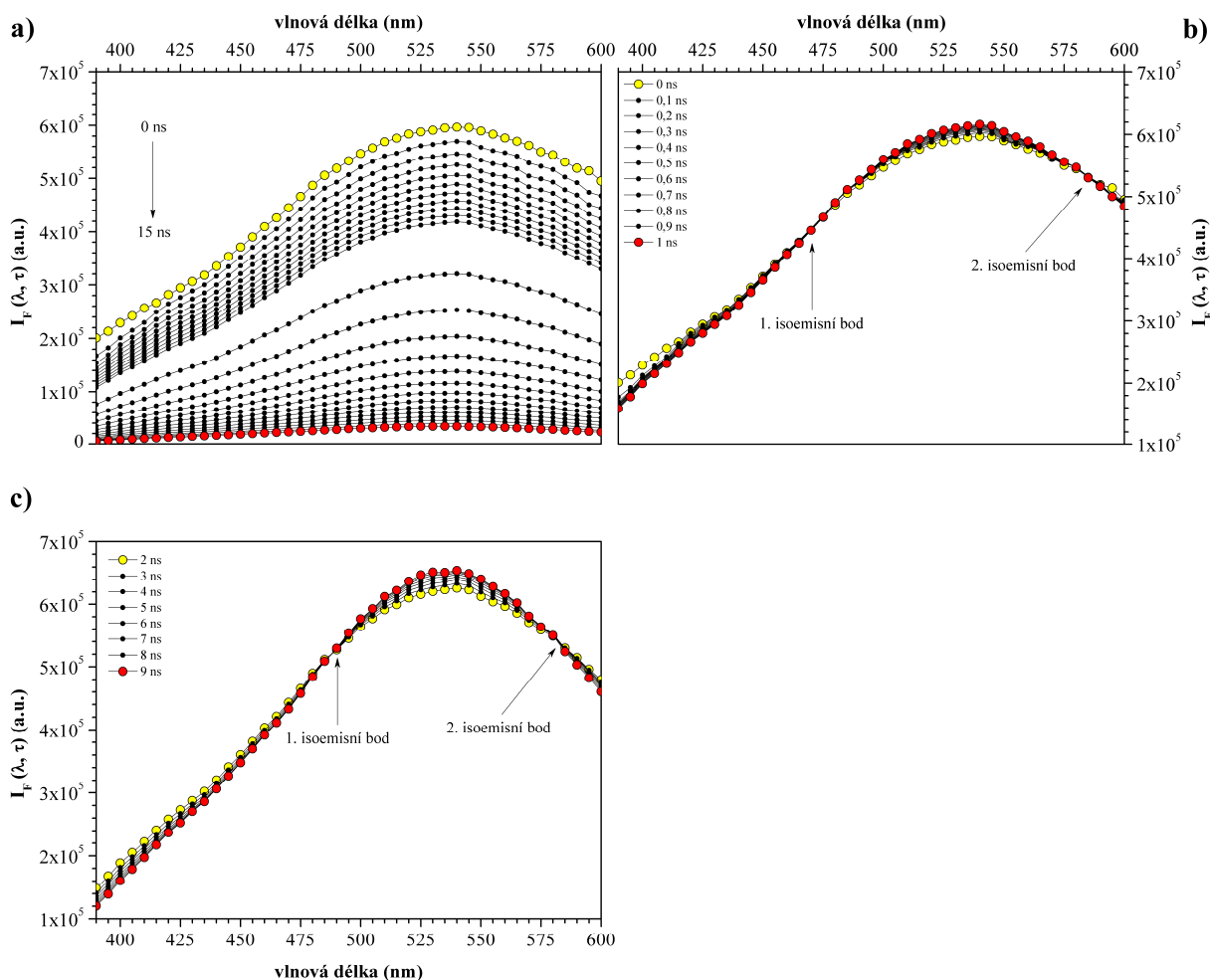
Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 5, studované vzorky vykazují typické hodnoty konstanty stability $\log K_a$ a parametru f_a HL izolovaných z terestriálních přírodních matric tzn. HL extrahovaných z rozličných půdních typů. V širším pohledu na dosažené výsledky konstanty stability systému $[\text{HL}-\text{Me}^{2+}]$ a parametru f_a můžeme konstatovat, že půdní HK je v porovnání se svým protějškem charakterizována vyšší stabilitou $[\text{HL}-\text{Me}^{2+}]$ komplexů a podílu počáteční fluorescence, která je schopna podlehnout statickému zhášení s Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} ionty. Naproti

tomu byla FK izolovaná z úrodné půdy *Elliott Soil* charakterizována nižšími hodnotami těchto ukazatelů efektivity komplexace HL s těmito polutanty. Nejsilnější komplexy tvořila půdní HK s Hg^{2+} ionty, jejíž konstanta stability $\log K_a [\text{Hg}^{2+}]$ dosahovala nejvyšší hodnoty tj. $\approx 5,15$. Kromě toho je na tomto místě nutné říci, že tento systém $[\text{HK}-\text{Hg}^{2+}]$ podléhal statickému zhášení až z 89 %. Nejstabilnějším a nejpevněji vázaným iontem je v případě půdních HK rtuťnatý kationt. Naproti tomu jako nejméně stabilní komplexy byly charakterizovány ligandy půdních HL s Pb^{2+} ionty, jejichž hodnoty $\log K_a$ resp. $\log K_D$ byly nejnižší tj. $\log K_a[\text{HK}-\text{Pb}^{2+}] \approx 4,50$ a $\log K_a[\text{FK}-\text{Pb}^{2+}] \approx 3,70$. Podle této studie by mohly představovat jisté environmentální riziko Pb^{2+} ionty vázané půdními FK, které mohou být vyplavovány do nižších vrstev půdy z kontaminované ornice, anebo mohou být transportovány až do zdrojů podzemních vod.

5.4.5 Časově rozlišená fluorescenční spektrometrie huminových látek

Hlavní myšlenkou této části disertační práce bylo navrhnout a následně provést pilotní experimenty, které by přispěly k detailnějšímu pochopení dynamiky excitovaných stavů HL, které jsou velmi důležité k poznání fenoménů, jako jsou reakce a přenos náboje v excitovaném stavu a v neposlední řadě i viskozita mikroprostředí okolo excitovaných fluoroforů těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin. Za tímto účelem byla na základě provedené literární rešerše vybrána metoda měření časově rozlišených emisních spekter, ze kterých byly následně pomocí normalizace plochy pod křivkou TRES spekter zkonstruovány tzv. časově rozlišené přes plochu normalizované emisní spektra TRANES – *Time Resolved Area Normalized Emission Spectra*, která jsou dobrými ukazateli výše zmíněných procesů.

Na Obr. 6 jsou uvedena TRES a TRANES spektra HK pocházející z úrodné půdy *Elliott Soil*. Průběh časově rozlišených emisních spekter HK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* naznačuje, že vyhasínání fluorescence je ovlivněno probíhajícími procesy v excitovaných stavech. V případě výše zmíněných HK se jejich fluorescenční maxima v pozorovaném časovém intervalu 0–15 ns kontinuálně posunují k delším vlnovým délkám emise, a dochází tak k bathochromnímu posunu, který je zpravidla ukazatelem procesu relaxace rozpouštědla okolo excitovaných fluoroforů. V časově rozlišeném emisním spektru vzorku P2HK si nelze nepovšimnout velmi výrazného bathochromního posunu, jehož velikost byla v pozorovaném časovém intervalu $\approx 25 \pm 2,5$ nm. Z důvodu toho, že TRES spektra byla vypočtena pomocí parametrů proložení, které byly obdrženy z poklesů intenzit fluorescence měřených s krokem 5 nm, je tedy zřejmé, že hodnoty posunu resp. maxima jsou zatíženy chybou $\approx 2,5$ nm. Naproti tomu, se vzorek HK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (P1HK) vyznačoval posunem emisního maxima o velikosti $\approx 10 \pm 2,5$ nm. Z průběhu časově rozlišených emisních spekter půdních HK (P1HK a P2HK) je zřejmé, že určitá část emitujících fluoroforů se nachází v oblasti o vyšší viskozitě, kde se molekuly rozpouštědla vyskytují v různém stupni částečné zrelaxovanosti jako i excitované “supramolekuly” HK. Kromě toho, je na tomto místě nutné říci, že v případě efektů rozpouštědla emituje i jistý podíl fluoroforů, který je tvořen jak zrelaxovanými, tak i doposud nezrelaxovanými molekulami. Na základě těchto výsledků se můžeme domnívat, že určitá část excitovaných fluoroforů se nacházela v oblasti s odlišnou viskozitou mikroprostředí tzn. hydrofobních doménách, které jsou tvořeny nepolárními fragmenty orientovanými dovnitř “supramolekuly” HL. Naopak, polární stavební jednotky, které jsou substituovány převážně karboxylovými a hydroxylovými funkčními skupinami spoluvytvářejí tzv. vnější obal, této “supramolekulární” struktury HL.



Obr. 6: TRES a TRANES spektra standardu půdní HK *Elliott Soil*; **a**) časově rozlišené emisní spektrum (TRES); **b**, **c**) časově rozlišené přes plochu normalizované emisní spektrum (TRANES) v pozorovaných časech 0–1 ns a 2–9 ns

Průběh a tvar časově rozlišeného emisního spektra standardu *Elliott Soil* (viz. Obr. 6a) svědčí o tom, že během vyhasínání fluorescence nedochází k dynamickým procesům, jako jsou reakce v excitovaných stavech a v neposlední řadě i výše zmíněné efekty relaxace rozpouštědla. Ve všech zrekonstruovaných TRANES půdních HK si nelze nepovšimnout, že jednotlivé průběhy emisních píků se protnuly ve dvou isoemisních bodech. První isoemisní bod se nacházel na modré straně emisního spektra tzn. v oblasti vlnových délek $\approx 420\text{--}490\text{ nm}$, zatímco druhý bod byl lokalizován v oblasti vyšších vlnových délek emise tj. při $\approx 530\text{--}585\text{ nm}$. Z výše uvedených závěrů se můžeme domnívat, že za fluorescenci půdních HK jsou zodpovědné právě a jenom tři na sobě nezávislé emisní jednotky resp. fluorescenční druhy, které jsou v odborné literatuře označovány jako *species*. Z globálního hlediska můžeme říci, že v případě HK izolovaných z lesní půdy *Humic Podzol* dochází v průběhu vyhasínání fluorescence ke kontinuálnímu posunu emisního píku, který je následován dvěma isoemisními body, které jsou ukazateli tří druhů fluoroforů a jistého kontinua emisních jednotek vzniklého pomalou relaxací molekul rozpouštědla okolo excitovaných stavů fluorescenčních druhů situovaných v hydrofobních doménách HK. Průběh vyhasínání fluorescence standardu půdní HK *Elliott Soil* nebyl nikterak ovlivněn, a v důsledku toho můžeme předpokládat, že jednotlivé druhy fluoroforů jsou charakterizovány právě jednou dobou života excitovaného stavu $\tau_2\text{--}\tau_4$.

Průběh časově rozlišeného emisního spektra standardu FK pocházející z úrodné půdy *Elliott Soil* naznačuje, že vyhasínání fluorescence je v tomto případě ovlivněno probíhajícími procesy

v excitovaném stavu. V případě výše zmíněné FK se její fluorescenční maxima v pozorovaném časovém intervalu 0–15 ns nepřetržitě posunují k delším vlnovým délkám emise, a dochází tak k bathochromnímu posunu, který je obvykle dobrým indikátorem procesu relaxace rozpouštědla okolo excitovaných fluoroforů. Velikost bathochromního posunu, který je v odborné literatuře označován jako “*red-shift*”, byla v pozorovaném časovém intervalu stanovena na $\approx 15 \pm 2,5$ nm. Naproti tomu, u vzorku FK izolované z lesní půdy *Humic Podzol* (PFK) nebyl pozorován žádný posun fluorescenčního maxima, a tudíž se můžeme domnívat, že vyhasínání fluorescence této “*biokoloidní*” sloučeniny není ovlivněno probíhajícími procesy v excitovaných stavech, kam zpravidla řadíme výše zmíněné efekty relaxace rozpouštědla a v neposlední řadě i reakce v excitovaných stavech. Průběh časově rozlišeného emisního spektra půdního standardu *Elliott Soil* dává tušit, že určitá část populace emitujících fluoroforů se nachází v oblasti o vyšší viskozitě, kde se molekuly rozpouštědla vyskytují v různé míře částečné zrelaxovanosti jako i excitované “supramolekuly” FK. Na základě těchto výsledků můžeme konstatovat, že jistá část excitovaných fluoroforů se nacházela v oblasti s odlišnou viskozitou mikroprostředí tzn. hydrofobních doménách, které jsou tvořeny stavebními jednotkami nepolárního charakteru. Tyto unikátní oblasti supramolekulární struktury HL jsou stabilizovány převážně slabými disperzními interakcemi, jako jsou *van der Waalsovy* síly, π – π a π –CH₃. jednotlivé průběhy emisních píků půdních FK se protnuly ve dvou isoemisních bodech. První isoemisní bod se nacházel na modré straně emisního spektra tzn. v oblasti vlnových délek ≈ 410 – 435 nm, zatímco druhý bod byl lokalizován v oblasti vyšších vlnových délek emise tj. při ≈ 515 – 560 nm. Na základě výše sumarizovaných závěrů můžeme říci, že jako v případě půdních HK jsou za fluorescenci těchto “*biokoloidních*” sloučenin zodpovědné právě a jenom tři na sobě nezávislé emisní jednotky respektive fluorescenční druhy. Z globálního pohledu na dosažené výsledky lze konstatovat, že v případě FK pocházející z úrodné půdy *Elliott Soil* dochází během vyhasínání fluorescence k nepřetržitému posunu fluorescenčního maxima, který je následován přítomností dvou isoemisních bodů, které jsou výhradně ukazateli tří druhů fluoroforů a určitého kontinua emisních jednotek vzniklého pomalou relaxací molekul rozpouštědla okolo excitovaných stavů fluorescenčních druhů situovaných v hydrofobních doménách FK. Průběh vyhasínání fluorescence půdní FK není nikterak zatížen dynamickými procesy, a tudíž se můžeme domnívat, že jednotlivé *species* jsou charakterizovány právě jednou dobou života excitovaného stavu τ_2 – τ_4 .

Obdobných výsledků bylo dosaženo i v případě ostatních HL izolovaných z jihomoravského lignitu, *Leonarditu*, jihočeské rašeliny a rašeliny *Pahokee Peat*.

5.5 ¹³C NMR SPEKTROMETRIE HUMINOVÝCH LÁTEK

Hlavní snahou této části disertační práce bylo navrhnout a následně provést takové experimenty, které by bezpochyby přispěly k detailnějšímu poznání struktury, chemických a biologických vlastností těchto unikátních “*biokoloidních*” sloučenin. Vyjma standardů HL byly veškeré vzorky použité v této disertační práci podrobeny základnímu screeningu pomocí ¹³C NMR spektrometrie. Za tímto účelem byla ¹³C NMR spektra studovaných HL integrována v oblasti alifatických atomů uhlíku (0–45 ppm), *O*-alkylových a peptidových atomů uhlíku (45–106 ppm), aromatických a fenolických atomů uhlíku (106–165 ppm) a mimo jiné i v oblasti, jež náleží specifické absorpci karboxylových a karbonylových atomů ¹³C (165–220 ppm).

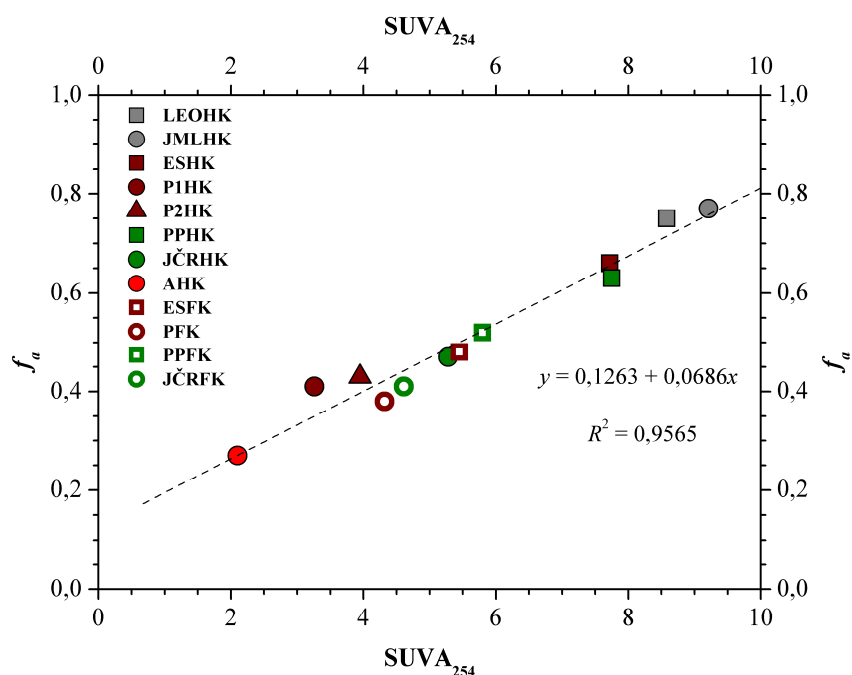
Tab. 6: Stanovené procentuální zastoupení uhlíkových atomů v příslušných integrálních regionech

vzorek HL	zastoupení ve spektrální oblasti (%)			
	0–45 ppm	45–106 ppm	106–165 ppm	165–220 ppm
JMLHK	12	6	61	21
P1HK	18	25	30	27
P2HK	19	31	37	13
JČRHK	16	21	33	30
AHK	38	21	22	19
PFK	16	34	31	19
JČRHK	24	20	30	26

Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 6, analyzované vzorky vykazují typické hodnoty procentuálního zastoupení uhlíkových atomů a strukturních parametrů HL izolovaných z terestriálních a kaustobiolitických přírodních matric. Z globálního hlediska lze konstatovat, že HK vyjma vzorku izolovaného z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) obsahují v porovnání s FK vyšší množství aromatických sloučenin, kam zpravidla řadíme strukturní jednotky ligninu, které mají svůj původ v látkách jako je 4-hydroxycinnamylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol. Kromě toho je na tomto místě nutné říci, že v této oblasti ^{13}C NMR spektra dochází mimo jiné i ke specifické absorpci fenolických uhlíků ^{13}C s maximem chemického posunu při 150 ppm. Naproti tomu byla půdní FK charakterizována nejvyšším obsahem *O*-alkylových a peptidových atomů ^{13}C . V této oblasti spektra obvykle nalézáme signály proteinů, alifatických alkoholů a polysacharidových jednotek tzn. celulózy a hemicelulózy, které jsou majoritními stavebními složkami buněčných stěn rostlin. Stanovené hodnoty procentuálního zastoupení uhlíkových atomů půdních HK (P1HK a P2HK) naznačují, že tyto vzorky jsou v porovnání se svou FK charakterizovány vyšším obsahem alifatických uhlíků mastných kyselin a vosků. Jak je patrné z výsledků uvedených v Tab. 6, FK izolovaná z lesní půdy *Humic Podzol* se vyznačovala relativně vyššími hodnotami signálů integrovaných v oblastech 45–106 ppm a 106–165 ppm, a tudíž můžeme říci, že tato půdní FK je oproti P1HK charakterizována vyšším obsahem *O*-alkylových, peptidických a aromatických sloučenin. Spektrometrie nukleární magnetické resonance navíc odhalila, že vzorek P2HK obsahuje nejmenší množství karboxylových a karbonylových funkčních skupin, jejichž specifická absorpce nastává v rozmezí chemických posunů 165–220 ppm. Rašelinistní HK se vyznačovala vyššími hodnotami procentuálního zastoupení uhlíkových atomů, které jsou zpravidla připisovány specifické absorpci *O*-alkylových, peptidových, aromatických, karboxylových a v neposlední řadě i karbonylových atomů ^{13}C . Z výše uvedeného faktu se můžeme domnívat, že tento vzorek je charakterizován vyšším stupněm humifikace, o kterém svědčí právě zmíněné hodnoty integrovaných oblastí ^{13}C NMR spektra. Jak je patrné z výsledků sumarizovaných v Tab. 6, FK izolovaná z jihočeské rašeliny (JČRHK) se oproti JČRHK vyznačovala nesrovnatelně vyšší hodnotou integrální oblasti 0–45 ppm, která je pokládána za oblast specifické absorpce alifatických atomů ^{13}C . Naproti tomu, HK izolovaná z jihomoravského lignitu (JMLHK) se v porovnání s ostatními HL vyznačovala nižšími hodnotami procentuálního zastoupení uhlíkových atomů připadajících specifické absorpci alifatických, *O*-alkylových a peptidových sloučenin. Kromě toho, je na tomto místě nutné říci, že stanovený obsah aromatických a fenolických sloučenin byl v případě výše zmíněného vzorku nominálně nejvyšší,

jehož hodnota v příslušné oblasti chemických posunů činila $\approx 61\%$. Tyto výsledky naznačují, že lignitická HK obsahuje oproti ostatním HL nejvyšší podíl aromatických struktur, které jsou substituovány polárními funkčními skupinami, o čemž svědčí i nejvyšší hodnota absorpčního koeficientu E_{ET}/E_{Bz} . Naproti tomu, si v Tab. 6 nelze nepovšimnout, že HK izolovaná z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum* (AHK) byla charakterizována nejvyšším obsahem alifatických struktur, jejichž specifická absorpce nastává v oblasti chemického posunu 0–45 ppm. Spektrometrie nukleární magnetické resonance mimo jiné ukázala, že tento vzorek je tvořen srovnatelným množstvím *O*-alkylových a peptidových sloučenin jako vzorek HK izolovaný z jihočeské rašeliny. Z výše uvedených výsledků se můžeme domnívat, že tento vzorek je převážně tvořen alifatickými řetězci a *O*-, *N*-alkylovými jednotkami, které jsou ukazateli mastných kyselin, vosků, proteinů a polysacharidů.

Za účelem ověření spojitosti mezi navrženým parametrem specifické absorpce $SUVA_{254}$ a indexem aromaticity f_a byla v této části disertační práce rekonstruována grafická závislost mezi výše zmíněnými koeficienty.



Obr. 7: Grafická závislost strukturního parametru f_a na specifických hodnotách absorpce $SUVA_{254}$ studovaných HL

Na Obr. 7 je uvedena grafická závislost strukturního parametru f_a na specifických hodnotách absorpce $SUVA_{254}$ HL izolovaných z uhelných, rašelinistních, půdních a v neposlední řadě i rostlinných přírodních matric. Kromě toho je na tomto místě nutné říci, že strukturní parametr f_a byl v případě standardů HL vypočten na základě procentuálního zastoupení uhlíkových atomů, jejichž hodnoty jsou veřejně dostupné na webových stránkách mezinárodní společnosti IHSS. Jak je z Obr. 7 zřejmé, lineární průběh grafické závislosti strukturního parametru f_a na absorpčním koeficientu $SUVA_{254}$ svědčí o velmi dobré korelaci mezi těmito koeficienty. Toto zjištění je velmi cenným výsledkem v oblasti studia a charakterizace HL, jelikož jsme schopni na základě absorpčního koeficientu $SUVA_{254}$ velmi dobře predikovat aromaticitu těchto “biokoloidních” sloučenin, aniž bychom znali kvantitativní zastoupení jednotlivých fragmentů tzn. alifatických řetězců, *O*-, *N*-alkylů a jakkoliv substituovaných aromátů. Výjimečnost tohoto závěru spočívá v tom, jestliže si uvědomíme, že strukturní parametr f_a je ukazatelem nejen obsahu aromatických sloučenin, ale především stupně aromaticity, který je definován jako podíl součtu aromatických

a fenolických atomů uhlíku ke všem atomům ^{13}C s výjimkou karboxylových a karbonylových funkčních skupin.

6 ZÁVĚR

Předkládaná disertační práce se zaměřuje na studium fyzikálně-chemických vlastností huminových látek (HL) prostřednictvím moderních instrumentálních metod, které jsou až na některé výjimky dostupné na pracovišti Centra materiálového výzkumu fakulty chemické VUT v Brně. Jak již bylo diskutováno dříve, HL představují pozoruhodný přírodní materiál a třebaže jsou předmětem soustavného výzkumu již po mnoho desetiletí, tak některé otázky nejsou doposud ne zcela objasněné. Tato dychtivost po zodpovězení alespoň některých otázek se stala velmi silnou motivací v průběhu celého studia, jejímž výstupem je tato disertační práce, která se zabývá studiem těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin. Tyto “biokoloidy” jsou spoluzodpovědné za úrodnost půdy, silnou mírou se podílejí na transportu živin ke kořenovému vlášení rostlin a mimo jiné jsou schopny imobilizovat širokou škálu hydrofilních a hydrofobních polutantů. Právě tyto unikátní vlastnosti předurčují výše zmíněné HL k širokému aplikačnímu potenciálu, jenž by měl být zcela jistě využit, a to v nejrůznějších oblastech lidské činnosti, ať už máme na mysli ochranu životního prostředí, zemědělství, průmysl či biomedicínské aplikace. Z výše uvedeného výčtu je nepochybně zjevné, že pro budoucí aplikace je nezbytně nutná znalost struktury a s ní spojené reaktivity těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin. Jeden z možných způsobů jak mohou být HL studovány představuje využití nedestruktivních tzn. spektrometrických instrumentálních technik. V rámci této disertační práce byly jako vhodné “biokoloidní” sloučeniny vybrány HL izolované z jihomoravského lignitu, jihočeské rašeliny, lesní půdy *Humic Podzol* a v neposlední řadě i vzorek HK pocházející z extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum*. S ohledem na celistvost této disertační práce byly mimo jiné studovány i standardy HL, které jsou běžně k dostání od mezinárodní společnosti pro výzkum huminových látek (IHSS – *International Humic Substances Society*). Za tímto účelem byly vybrány standardy IHSS, které byly izolovány z obdobných terestriálních matric, jako výše zmíněné vzorky HL tzn. *Leonardite* HK, *Elliott Soil* HL a *Pahokee Peat* HL. Na základě takto uceleného souboru HL můžeme detailněji diskutovat jednotlivé difference, jež jsou ukazateli rozdílné struktury a reaktivity těchto “biokoloidních” sloučenin.

Experimentální část disertační práce se zaměřuje na studium fyzikálně-chemických vlastností HL s ohledem na poznání jejich původu resp. geneze, jednotlivých strukturních fragmentů, množství substituentů uplatňujících elektron-donorní a elektron akceptorní efekt, obsahu reaktivních funkčních skupin, heterogenity, aromaticity, stupně humifikace atd. Jak z profilace experimentální části vyplývá, tato disertační práce prezentuje inovativní přístup studia HL, a to především v oblasti infračervené a fluorescenční spektrometrie. Z naměřených DRIFTS spekter studovaných vzorků bylo zřejmé, že v oblasti “otisku palce” znesnadňují interpretaci infračervených spekter HL překrývající se absorpční pásy jednotlivých funkčních skupin. Tato nesnáz byla v této disertační práci vyřešena pomocí Fourierovy autodekonvoluce. Kromě toho je na tomto místě nutné říci, že po aplikaci Fourierovy autodekonvoluce došlo v naměřených infračervených spektrech k identifikaci specifických absorpčních pásů, které dozajista přispěly k detailnějšímu poznání struktury těchto “biokoloidních” sloučenin. Především se jednalo o strukturní jednotky, které obsahovaly etherové a esterové vazby přítomné v aromatických a alifatických sloučeninách. Tato metoda rovněž poukázala na přítomnost strukturních jednotek ligninu, kam zpravidla řadíme aromatické sloučeniny, které jsou odvozeny od *p*-kumarylalkoholu, koniferylalkoholu a sinapylalkoholu. Tyto závěry byly mimo jiné podpořeny i výsledky z ^{13}C NMR spektrometrie, která nám poskytla nové informace o struktuře a obsahu jednotlivých funkčních skupin resp. strukturních jednotek. ^{13}C NMR spektrometrie jednoznačně ukázala, že

navržené strukturní parametry jsou velmi dobrými ukazateli aromaticity, hydrofilnosti resp. hydrofobnosti a mimo jiné i biologické účinnosti těchto “biokoloidních” sloučenin. Navíc si v této disertační práci nelze nepovšimnout, že ^{13}C NMR spektrometrie se stala velmi dobrým nástrojem k potvrzení již vyřčených hypotéz a závěrů, ať už máme na mysli kvalitativní či fyzikálně-chemické vlastnosti použitých HL. Výsledky z elementární analýzy resp. *van Kreveleneho diagramu* naznačují, že tato instrumentální technika je vhodnou metodou k rychlé a snadné interpretaci některých fyzikálně-chemických vlastností, jako je obsah biogenních prvků, mechanismus humifikace, podíl aromatických resp. alifatických strukturních jednotek, odhad stupně (de)hydrogenace, oxidace a dekarboxylace. K dalším významným parametrům, které byly v této disertační práci diskutovány, a jenž je třeba brát v potaz, patří absorpční koeficienty, hodnoty specifických absorbancí a fluorescenční indexy. Výsledky jasně poukázaly na zcela nepostradatelnou úlohu výše zmíněných koeficientů, jež jsou ukazateli střední molekulové hmotnosti, stupně humifikace, obsahu polárních funkčních skupin substituovaných na aromátech, původu aj. Z naměřených excitačně-emisních fluorescenčních spekter vyplývá, že HL izolované z terestriálních přírodních matric jsou principiálně charakterizovány dvěma fluorescenčními maximy, z nichž $A(\alpha)$ – *fulvic-like* fluorofor se nachází v oblasti vlnových délek $\approx 250\text{--}280/420\text{--}525\text{ nm}$ v tzv. *UV-light* oblasti, kdežto fluorescenční pík $C(\alpha)$ – *humic-like* byl lokalizován v oblasti vyšších vlnových délek excitace $\approx 300\text{--}385/425\text{--}520\text{ nm}$. V EEM spektrech HK izolovaných z uhelných, rašeliništních a půdních přírodních matric byly namísto fluorescenčního maxima $C(\alpha)$ lokalizovány tzv. odvozené *humic-like* fluorofory, které se nacházejí v oblasti vyšších vlnových délek excitace a emise $\approx 440\text{--}460/520\text{--}590\text{ nm}$. Fluorescenční spektrometrie mimo jiné ukázala, že tato metoda je velmi vhodnou instrumentální technikou k identifikaci fluorescenčních maxim nehumínového charakteru. Aby bylo možné blíže diskutovat reaktivitu těchto “biokoloidních” sloučenin byly v této disertační práci provedeny jednoduché komplexační experimenty, které jednoznačně ukázaly, že nejstabilnějším a tedy i nejpevněji vázaným iontem je v případě půdních HL rtuťnatý kation. Klíčovou a mimo jiné i velmi inovativní kapitolou této disertační práce je využití časově rozlišené fluorescenční spektrometrie v oblasti studia a charakterizace HL. Poprvé je zde použita metoda měření časově rozlišených emisních spekter a z nich vypočtených časově rozlišených přes plochu normalizovaných spekter TRANES. Výsledky z časově rozlišených emisních spekter jasně ukázaly, že tato instrumentální technika je velmi vhodnou metodou studia relaxace rozpouštědla okolo excitovaných fluoroforů HL. Mimo jiné se podařilo zjistit, že za fluorescenci HL jsou spoluzodpovědné pouze a jenom tři na sobě nezávislé emisní jednotky resp. fluorescenční druhy. Za velmi cenný výsledek této disertační práce považujeme fakt, že se nám podařila experimentálně dokázat přítomnost hydrofobních domén ve struktuře HL.

7 LITERATURA

- [1] PEURAVUORI, J. a PIHLAJA, K. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Analytica Chimica Acta*. 1997, vol. 337, no. 2, p. 133–149.
- [2] CHEN, Y., SENESI, N., SCHNITZER, M. Information Provided on Humic Substances by E4/E6 Ratios. *Soil Science Society of America Journal*. 1977, vol. 41, no. 2, p. 352–358.
- [3] CHEN, J., GU, B., LEBOEUF, E. J., PAN, H., DAI, S. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere*. 2002, vol. 48, no. 1, p. 59–68.
- [4] KUMADA, K. *Chemistry of soil organic matter*. New York: Elsevier, 1987, xi, 241 p. ISBN 04-449-8936-6.
- [5] BARANČÍKOVÁ, G., SENESI, N., BRUNETTI, G. Chemical and spectroscopic characterization of humic acids isolated from different Slovak soil types. *Geoderma*. 1997, vol. 78, no. 3–4, p. 251–266.
- [6] HAUTALA, K., PEURAVUORI, J., PIHLAJA, K. Measurement of aquatic humus content by spectroscopic analyses. *Water Research*. 2000, vol. 34, no. 1, p. 246–258.
- [7] BAKER, A. a SPENCER, R. B. G. Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy. *Science of The Total Environment*. 2004, vol. 333, no. 1–3, p. 217–232.
- [8] ANDERSEN, D. O., ALBERTS, J. J., TAKÁCS, M. Nature of natural organic matter (NOM) in acidified and limed surface waters. *Water Research*. 2000, vol. 34, no. 1, p. 266–278.
- [9] KORSHIN, G. V., LI, Ch. W., BENJAMIN, M. M. Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: A consistent theory. *Water Research*. 1997, vol. 31, no. 7, p. 1787–1795.
- [10] FUENTES, M., GONZÁLEZ-GAITANO G., GARCÍA-MINA, J. M. The usefulness of UV–visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts. *Organic Geochemistry*. 2006, vol. 37, no. 12, p. 1949–1959.
- [11] CHIN, Y. P., AIKEN, G., O'LOUGHLIN, E. Molecular Weight, Polydispersity, and Spectroscopic Properties of Aquatic Humic Substances. *Environmental Science*. 1994, vol. 28, no 11, p. 1853–1858.
- [12] KALBITZ, K., GEYER, W., GEYER, S. Spectroscopic properties of dissolved humic substances – a reflection of land use history in a fen area. *Biogeochemistry*. 1999, vol. 47, no. 2, p. 219–238.
- [13] WEISHAAR, J. L., AIKEN, G. R., BERGAMASCHI, B. A., FRAM, M. S., FUJII, R., MOPPER, K. Evaluation of Specific Ultraviolet Absorbance as an Indicator of the Chemical Composition and Reactivity of Dissolved Organic Carbon. *Environmental Science*. 2003, vol. 37, no. 20, p. 4702–4708.
- [14] HAY, M. B. a MYNENI, S. C. B. Structural environments of carboxyl groups in natural organic molecules from terrestrial systems. Part 1: Infrared spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2007, vol. 71, no. 14, p. 3518–3532.
- [15] GEYER, W., HEMIDI, F. A. H., BRÜGGEMANN, L., HANSCHMANN, G. Investigation of soil humic substances from different environments using TG–FTIR and multivariate data analysis. *Thermochimica Acta*. 2000, vol. 361, no. 1–2, p. 139–146.
- [16] GIOVANELA, M., PARLANTI, E., SORIANO-SIERRA, E. J., SOLDI, M. S., SIERRA, M. M. D., SENESI, N., MIANO, T. M., PROVENZANO, M. R. Elemental compositions, FT-IR spectra and thermal behavior of sedimentary fulvic and humic acids from aquatic and terrestrial environments. *Geochemical Journal*. 2004, vol. 38, no. 3, p. 63–73.
- [17] KUCKUK, R., HILL, W., BURBA, P. Pyrolysis-GC-FTIR for structural elucidation of aquatic humic substances. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 1994, vol. 350, no. 7–9, p. 528–532.
- [18] ABBT-BRAUN, G., LANKES, U., FRIMMEL, F. H. Structural characterization of aquatic humic substances – The need for a multiple method approach. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries*. 2004, vol. 66, no. 2, p. 151–170.

- [19] VERGNOUX, A., GUILIANO, M., DI ROCCO, R., DOMEIZEL, M., THÉRAULAZ, F., DOUMENQ, P. Quantitative and mid-infrared changes of humic substances from burned soils. *Environmental Research*. 2011, vol. 111, no. 2, p. 205–214.
- [20] SANTOS, E. B. H. a DUARTE, A. C. The influence of pulp and paper mill effluents on the composition of the humic fraction of aquatic organic matter. *Water Research*. 1998, vol. 32, no. 3, p. 597–608.
- [21] IBARRA, J. V., MUÑOZ, E., MOLINER, R. FTIR study of the evolution of coal structure during the coalification process. *Organic Geochemistry*. 1996, vol. 24, no. 6–7, p. 725–735.
- [22] STEVENSON, F. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd Ed. New York: John Wiley and Sons, xiii, 496 p. ISBN 04-715-9474-1.
- [23] SANTOS, P. S. M., OTERO, M., DUARTE, R. B. B. O., DUARTE, A. C. Spectroscopic characterization of dissolved organic matter isolated from rainwater. *Chemosphere*. 2009, vol. 74, no. 8, p. 1053–1061.
- [24] ARTZ, R. R. E., CHAPMAN, S. J., ROBERTSON, A. H. J., POTTS, J. M., LAGGOUN-DÉFARGE, F., GOGO, S., COMONT, L., DISNAR, J. R., FRANCEZ, A. J. FTIR spectroscopy can be used as a screening tool for organic matter quality in regenerating cutover peatlands. *Soil Biology and Biochemistry*. 2008, vol. 40, no. 2, p. 515–527.
- [25] BAES, A. U. a BLOOM, P. R. Diffuse Reflectance and Transmission Fourier Transform Infrared (DRIFT) Spectroscopy of Humic and Fulvic Acids. *Soil Science Society of America Journal*. 1989, vol. 53, no. 3, p. 695–700.
- [26] FRANCIOSO, O., SÀNCHEZ-CORTÉS, S., TUGNOLI, V., MARZADORI, C., CIAVATTA, C. Spectroscopic study (DRIFT, SERS and ¹H NMR) of peat, leonardite and lignite humic substances. *Journal of Molecular Structure*. 2001, no. 565–566, p. 481–485.
- [27] ALBERTS, J. J. a TAKÁCS, M. Total luminescence spectra of IHSS standard and reference fulvic acids, humic acids and natural organic matter: comparison of aquatic and terrestrial source terms. *Organic Geochemistry*. 2004, vol. 35, no. 3, p. 243–256.
- [28] COBLE, P. G. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry*. 1996, vol. 51, no. 4, p. 325–346.
- [29] SENESI, N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. *Analytica Chimica Acta*. 1990, vol. 232, no. 1, p. 77–106.
- [30] SIERRA, M. M. D., GIOVANELA, M., PARLANTI, E., SORIANO-SIERRA, E. J. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere*. 2005, vol. 58, no. 6, p. 715–733.
- [31] PARLANTI, E., WÖRZ, K., GEOFFROY, L., LAMOTTE, M. Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry*. 2000, vol. 31, no. 12, p. 1765–1781.
- [32] HENDERSON, R. K., BAKER, A., MURPHY, K. R., HAMBLY, A., STUETZ, R. M., KHAN, S. J. Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: A review. *Water Research*. 2009, vol. 43, no. 4, p. 863–881.
- [33] PEIRIS, R. H., BUDMAN, H., MORESOLI, C., LEGGE, R. L. Identification of humic acid-like and fulvic acid-like natural organic matter in river water using fluorescence spectroscopy. *Water Science*. 2011, vol. 63, no. 10, p. 2427–2433.
- [34] HUDSON, N., BAKER, A., WARD, D., REYNOLDS, D. M., BRUNSDON, Ch., CARLIELL-MARQUET, C., BROWNING, S. Can fluorescence spectrometry be used as a surrogate for the Biochemical Oxygen Demand (BOD) test in water quality assessment ? An example from South West England. *Science of The Total Environment*. 2008, vol. 391, no. 1, p. 149–158.

- [35] MENDONÇA, A., ROCHA, A. C., DUARTE, A. C., SANTOS, E. B. H. The inner filter effects and their correction in fluorescence spectra of salt marsh humic matter. *Analytica Chimica Acta*. 2013, vol. 788, no. 25, p. 99–107.
- [36] MCKNIGHT, D. M., BOYER, E. W., WESTERHOFF, P. K., DORAN, P. T., KULBE, T., ANDERSEN, D. T. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnology and Oceanography*. 2001, vol. 46, no. 1, p. 38–48.
- [37] HUGUET, A., VACHER, L., RELEXANS, S., SAUBUSSE, S., FROIDEFOND, J. M., PARLANTI, E. Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry*. 2009, vol. 40, no. 6, p. 706–719.
- [38] ZSOLNAY, A., BAIGAR, E., JIMENEZ, M., STEINWEG, B., SACCOMANDI, F. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere*. 1999, vol. 38, no. 1, p. 45–50.
- [39] MILORI, D. M. B. P., MARTIN-NETO, L., BAYER, C., MIELNICZUK, J., BAGNATO, V. S. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*. 2002, vol. 167, no. 11, p. 739–749.
- [40] MOBED, J. J., HEMMINGSEN, S. L., AUTRY, J. L., MCGOWN, L. B. Fluorescence Characterization of IHSS Humic Substances: Total Luminescence Spectra with Absorbance Correction. *Environmental Science*. 1996, vol. 30, no. 10, p. 3061–3065.
- [41] CABANISS, S. E., ZHOU, Q., MAURICE, P. A., CHIN, Y. P., AIKEN, G. R. A Log-Normal Distribution Model for the Molecular Weight of Aquatic Fulvic Acids. *Environmental Science*. 2000, vol. 34, no. 6, p. 1103–1109.
- [42] ALBERTS, J. J. a TAKÁCS, M. Comparison of the natural fluorescence distribution among size fractions of terrestrial fulvic and humic acids and aquatic natural organic matter. *Organic Geochemistry*. 2004, vol. 35, no. 10, p. 1141–1149.
- [43] STEDMON, C. A., MARKAGER, S., BRO, R. Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry*. 2003, vol. 82, no. 3–4, p. 239–254.
- [44] HAO, R., REN, H., LI, J., MA, Z., WAN, H., ZHENG, X., CHENG, S. Use of three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy for predicting the disinfection by-product formation potential of reclaimed water. *Water Research*. 2012, vol. 46, no. 17, p. 5765–5776.
- [45] LIU, T., CHEN, Z. L., YU, W. Z., YOU, S. J. Characterization of organic membrane foulants in a submerged membrane bioreactor with pre-ozonation using three-dimensional excitation–emission matrix fluorescence spectroscopy. *Water Research*. 2011, vol. 45, no. 5, p. 2111–2121.
- [46] GARCÍA-GIL, J. C., PLAZA, C., FERNÁNDEZ, J. M., SENESI, N., POLO, A. Soil fulvic acid characteristics and proton binding behavior as affected by long-term municipal waste compost amendment under semi-arid environment. *Geoderma*. 2008, vol. 146, no. 1–2, p. 363–369.
- [47] PLAZA, C., SENESI, N., GARCÍA-GIL, J. C., BRUNETTI, G., D'ORAZIO, V., POLO, A. Effects of Pig Slurry Application on Soils and Soil Humic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, vol. 50, no. 17, p. 4867–4874.
- [48] BRUNETTI, G., POLO, A., GARCÍA-GIL, J. C., PLAZA, C., SENESI, N. Effects of sewage sludge amendment on humic acids and microbiological properties of a semiarid Mediterranean soil. *Biology and Fertility of Soils*. 2004, vol. 39, no. 5, p. 320–328.
- [49] PEDRA, F., PLAZA, C., FERNÁNDEZ, J. M., GARCÍA-GIL, J. C., POLO, A. Effects of municipal solid waste compost and sewage sludge on chemical and spectroscopic properties of humic acids from a sandy Haplic Podzol and a clay loam Calcic Vertisol in Portugal. *Waste Management*. 2008, vol. 28, no. 11, p. 2183–2191.

- [50] ZHAO, J. a NELSON, D. J. Fluorescence study of the interaction of Suwannee River fulvic acid with metal ions and Al^{3+} – metal ion competition. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2005, vol. 99, no. 2, p. 383–396.
- [51] ZHANG, D., PAN, X., MOSTOFA, K. M. G., CHEN, X., MU, G., WU, F., LIU, J., SONG, W., YANG, J., LIU, Y., FU, Q. Complexation between Hg(II) and biofilm extracellular polymeric substances: An application of fluorescence spectroscopy. *Journal of Hazardous Materials*. 2010, vol. 175, no. 1–3, p. 359–365.
- [52] ESTEVES DA SILVA, J., MACHADO, A. A. S. C., OLIVEIRA, C. J. S., PINTO, M. S. S. D. S. Fluorescence quenching of anthropogenic fulvic acids by Cu(II), Fe(III) and UO₂. *Talanta*. 1998, vol. 45, no. 6, p. 1155–1165.
- [53] PLAZA, C., BRUNETTI, G., SENESI, N., POLO, A. Molecular and Quantitative Analysis of Metal Ion Binding to Humic Acids from Sewage Sludge and Sludge-Amended Soils by Fluorescence Spectroscopy. *Environmental Science*. 2006, vol. 40, no. 3, p. 917–923.
- [54] SENESI, N. a LOFFREDO, E. Metal Ion Complexation by Soil Humic Substances. In: *Chemical Processes in Soils*. Ed. M. A. Tabatabai, D. L. Sparks, Madison, Soil Science Society of America, 2005, p. 563–617. ISBN 978-0-89118-892-6.
- [55] ELKINS, K. M. a NELSON, D. J. Spectroscopic approaches to the study of the interaction of aluminum with humic substances. *Coordination Chemistry Reviews*. 2002, vol. 228, no. 2, p. 205–225.
- [56] SENESI, N. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. *Analytica Chimica Acta*. 1990, vol. 232, p. 77–106.
- [57] HERNÁNDEZ, D., PLAZA, C., SENESI, N., POLO, A. Detection of Copper(II) and zinc(II) binding to humic acids from pig slurry and amended soils by fluorescence spectroscopy. *Environmental Pollution*. 2006, vol. 143, no. 2, p. 212–220.
- [58] PLAZA, C., D'ORAZIO, V., SENESI, N. Copper(II) complexation of humic acids from the first generation of EUROSOLS by total luminescence spectroscopy. *Geoderma*. 2005, vol. 125, no. 1–2, p. 177–186.
- [59] RYAN, D. K. a WEBER, J. H. Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability constants of fulvic acid. *Analytical Chemistry*. 1982, vol. 54, no. 6, p. 986–990.
- [60] ANTUNES, M. C. G., PEREIRA, C. C. C., ESTEVES DA SILVA, J. C. G. MCR of the quenching of the EEM of fluorescence of dissolved organic matter by metal ions. *Analytica Chimica Acta*. 2007, vol. 595, no. 1–2, p. 9–18.
- [61] MERDY, P., TARCHOUNA GHARBI, L., MILORI, D. M. P., RIBEIRO, R. A. S., LUCAS, Y. A new method using laser induced fluorescence quenching for studying metal complexes in the solid state applied to Cr(III), Cu(II) and Pb(II) in sandy soils. *Geoderma*. 2009, vol. 150, no. 1–2, p. 179–187.
- [62] LU, X. Interaction between Hg(II) and natural dissolved organic matter: a fluorescence spectroscopy based study. *Water Research*. vol. 35, no. 7, p. 1793–1803.
- [63] MCGOWN, L. B., HEMMINGSEN, S. L., SHAVER J. M., GENG, L. Total Lifetime Distribution Analysis for Fluorescence Fingerprinting and Characterization. *Applied Spectroscopy*. 1995, vol. 49, no. 1, p. 60–66.
- [64] KUMKE, M. U., TISEANU, C., ABBT-BRAUN, G., FRIMMEL, F. H. Fluorescence Decay of Natural Organic Matter (NOM) – Influence of Fractionation, Oxidation, and Metal Ion Complexation. *Journal of Fluorescence*. vol. 8, no. 4, p. 309–318.
- [65] KUMKE, M. U., ABBT-BRAUN, G., FRIMMEL, F. H., MILNE, P. J., ODUM, D. S., ZIKA, R. G. Time-resolved Fluorescence Measurements of Aquatic Natural Organic Matter (NOM). *Acta hydrochimica et hydrobiologica*. 1998, vol. 26, no. 2, p. 73–81.
- [66] KUMKE, M. U., ZWIENER, C., ABBT-BRAUN, G., FRIMMEL, F. H. Spectroscopic Characterization of Fulvic Acid Fractions of a Contaminated Groundwater. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*. 1999, vol. 27, no. 6, p. 409–415.

- [67] FRIMMEL, F. a ABBT-BRAUN, G. Basic characterization of reference NOM from Central Europe – Similarities and differences. *Environment International*. 1999, vol. 25, no. 2–3, p. 191–207.
- [68] PERIASAMY, N. a KOTI, A. S. R. Time Resolved Fluorescence Spectroscopy: TRES and TRANES. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. 2003, vol. 69, no. 1, p. 41–48.
- [69] PICCOLO, A., CAMPANELLA L., PETRONIO B. M. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Soil Humic Substances Extracted by Different Mechanisms. *Soil Science Society of America Journal*. 1990, vol. 54, no. 3, p. 750–756.
- [70] MOPPER, K., STUBBINS, A., RITCHIE, J. D., BIALK, H. M., HATCHER, P. G. Advanced Instrumental Approaches for Characterization of Marine Dissolved Organic Matter: Extraction Techniques, Mass Spectrometry, and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Chemical Reviews*. 2007, vol. 107, no. 2, p. 419–442.
- [71] HATCHER, P. G., SCHNITZER, M., DENNIS, L. W., MACIEL, G. E. Aromaticity of Humic Substances in Soils. *Soil Science Society of America Journal*. 1981, vol. 45, no. 6, p. 1089–1094.
- [72] PICCOLO, A., NARDI, S., CONCHERI, G. Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. *Soil Biology and Biochemistry*. 1992, vol. 24, no. 4, p. 373–380.
- [73] CANELLAS, L. P., DOBBSS, L. B., OLIVEIRA, A. L., CHAGAS, J. G., AGUIAR, N. O., RUMJANEK, V. M., NOVOTNY, E. H., OLIVARES, F. L., SPACCINI, R., PICCOLO, A. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. *European Journal of Soil Science*. 2012, vol. 63, no. 3, p. 315–324.
- [74] NOVÁK, F. a HRABAL, R. Kvantitativní ^{13}C NMR spektroskopie huminových látek. *Chemické listy*. 2011, vol. 105, no. 10, p. 752–760.
- [75] AGUIAR, N. O., NOVOTNY, E. H., OLIVEIRA, A. L., RUMJANEK, V. M., OLIVARES, F. L., CANELLAS, L. P. Prediction of humic acids bioactivity using spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Geochemical Exploration*. 2013, vol. 129, p. 95–102.
- [76] PANE, C., SPACCINI, R., PICCOLO, A., SCALA, F., BONANOMI, G. Compost amendments enhance peat suppressiveness to *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor*. *Biological Control*. 2011, vol. 56, no. 2, p. 115–124.
- [77] DOBBSS, L. B., PASQUALOTO CANELLAS, L., LOPES OLIVARES, F., OLIVEIRA AGUIAR, N., PERES, L. E. P., AZEVEDO, M., SPACCINI, R., PICCOLO, A., FAÇANHA, A. R. Bioactivity of Chemically Transformed Humic Matter from Vermicompost on Plant Root Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, vol. 58, no. 6, p. 3681–3688.
- [78] Source Materials for IHSS Samples: Standard Samples. PERDUE, M. *International Humic Substances Society: Natural Organic Matter Research* [online]. 1. Denver, Colorado, USA: IHSS, © 2015, 14.03.2015 [cit. 2015-09-13]. Available from: <http://www.humicsubstances.org/sources.html>
- [79] HOBLEY, E., WILLGOOSE, G. R., FRISIA, S., JACOBSEN, G. Vertical distribution of charcoal in a sandy soil: evidence from DRIFT spectra and field emission scanning electron microscopy. *European Journal of Soil Science*. 2014, vol. 65, no. 5, p. 751–762.

8 ŽIVOTOPIS

Osobní informace

Jméno a příjmení: Vojtěch Enev
Datum a místo narození: 16. 03. 1986, Brno
Adresa: Popeláková 10, 62800, Brno
Národnost: česká
E-mail: xcenev@fch.vutbr.cz

Vzdělání

2011 – současnost

VUT v Brně, Fakulta chemická; Doktorský studijní program:
Fyzikální chemie; Obor: Fyzikální chemie; Téma disertační
práce: *Spektrometrické metody pro výzkum huminových látek*

2009 – 2011

VUT v Brně, Fakulta chemická; Magisterský studijní program:
Spotřební chemie; Obor: Spotřební chemie; Téma diplomové
práce: *Vliv aplikace kompostu na vlastnosti půdních
huminových látek*

2006 – 2009

VUT v Brně, Fakulta chemická; Bakalářský studijní program:
Chemie a chemické technologie; Obor: Spotřební chemie;
Téma bakalářské práce: *Studium huminových a fulvinových
kyselin excitačně-emisní metodou*

2002 – 2006

Střední průmyslová škola chemická v Brně; Studijní obor:
Aplikovaná analytická chemie

Vědecká a publikační činnost autora

Články v impaktovaném časopise

DOSKOČIL, L., GRASSET, L., ENEV, V., KALINA, L., PEKAŘ, M. Study of water - extractable fractions from South Moravian lignite. *ENVIRON EARTH SCI.* 2015, vol. 73, no. 7, p. 3873–3885. ISSN 1866-6280

ENEV, V., POSPÍŠILOVÁ, Ľ., KLUČÁKOVÁ, M., LIPTAJ, T., DOSKOČIL, L. Spectral Characterization of Selected Natural Humic Substances. *Soil and Water Research.* 2014, vol. 9, no. 1, p. 9–17. ISSN 1801-5395

YADAV, R., HAVLICA, J., HNATKO, M., ŠAJGALÍK, P., CIGÁŇ, A., PALOU, M., BARTONÍČKOVÁ, E., BOHÁČ, M., FRAJKOROVÁ, F., MÁŠILKO, J., ZMRZLÝ, M., KALINA, L., HAJDÚCHOVÁ, M., ENEV, V. Magnetic properties of $\text{Co}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ spinel ferrite nanoparticles synthesized by starch-assisted sol-gel auto-combustion method and its ball milling. *J. Magnetism Magn. Mat.* 2014, vol. 378, p. 190–199. ISSN 0304-8853

YADAV, R., HAVLICA, J., KUŘITKA, I., KOŽÁKOVÁ, Z., BARTONÍČKOVÁ, E., MÁŠILKO, J., KALINA, L., WASSERBAUER, J., HAJDÚCHOVÁ, M., ENEV, V. Structural and Magnetic Properties of $\text{CoFe}_2\text{-xGdxO}_4$

($x = 0.0\text{--}0.1$) Spinel Ferrite Nanoparticles synthesized by Starch-Assisted Sol-Gel Auto-combustion Method. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*. 2015, vol. 28, p. 1797–1806. ISSN 1557-1947

YADAV, R., HAVLICA, J., KUŘITKA, I., KOŽÁKOVÁ, Z., MÁSilKO, J., HAJDÚCHOVÁ, M., ENEV, V., WASSERBAUER, J. Effect of Pr^{3+} Substitution on Structural and Magnetic Properties of CoFe_2O_4 Spinel Ferrite Nanoparticles. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*. 2014, vol. 28, p. 241–248. ISSN 1557-1947

YADAV, R., HAVLICA, J., KUŘITKA, I., KOŽÁKOVÁ, Z., PALOU, M., BARTONÍČKOVÁ, E., BOHÁČ, M., FRAJKOROVÁ, F., MÁSilKO, J., KALINA, L., HAJDÚCHOVÁ, M., ENEV, V., WASSERBAUER, J. Magnetic Properties of Dysprosium-Doped Cobalt Ferrite Nanoparticles Synthesized by Starch-Assisted Sol-Gel Auto-Combustion Method. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*. 2015, vol. 28, p. 2097–2107. ISSN 1557-1947

YADAV, R., HAVLICA, J., KUŘITKA, I., KOŽÁKOVÁ, Z., PALOU, M., BARTONÍČKOVÁ, E., BOHÁČ, M., FRAJKOROVÁ, F., MÁSilKO, J., HAJDÚCHOVÁ, M., ENEV, V., WASSERBAUER, J. Magnetic Properties of ZnFe_2O_4 Nanoparticles Synthesized by Starch-Assisted Sol-Gel Auto-combustion Method. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*. 2014, vol. 28, p. 1417–1423. ISSN 1557-1947

YADAV, R., HAVLICA, J., MÁSilKO, J., KALINA, L., HAJDÚCHOVÁ, M., ENEV, V., WASSERBAUER, J., KUŘITKA, I., KOŽÁKOVÁ, Z. Structural, Cation Distribution, and Magnetic Properties of CoFe_2O_4 Spinel Ferrite Nanoparticles Synthesized Using a Starch-Assisted Sol-Gel Auto-Combustion Method. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*. 2015, vol. 28, p. 1851–1861. ISSN 1557-1947

YADAV, R., HAVLICA, J., PTÁČEK, P., KUŘITKA, I., KOŽÁKOVÁ, Z., PALOU, M., BARTONÍČKOVÁ, E., BOHÁČ, M., FRAJKOROVÁ, F., MÁSilKO, J., ZMRZLÝ, M., HAJDÚCHOVÁ, M., ENEV, V. Structural and Magnetic Properties of CoFe_2O_4 Nanoparticles Synthesized by Starch-Assisted Sol-Gel Auto-Combustion Method in Air, Argon, Nitrogen and Vacuum Atmospheres. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*. 2014, vol. 28, p. 249–258. ISSN 1557-1947

Články v recenzovaném časopise

POSPÍŠILOVÁ, L.; DRÁPELOVÁ, I.; ENEV, V. Characterization of Compost and Soil Humic Substances by Fluorescence Spectroscopy. *Journal of Life Sciences*. 2014, vol. 8, no. 4, p. 364–372. ISSN 1934-7391

Konferenční příspěvky indexované v databázi Web of Science

TÜRKEOVÁ, I., ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M. Thermodynamic analysis of Cu(II) and Pb(II) ion binding to humic acids isolated from different origins and structural characterization using FTIR and ^{13}C NMR spectroscopy. In *NANOCON 2015, proceedings of abstracts*. První. Ostrava, TANGER Lt. 2015, p. 96–101. ISBN 978-80-87294-59-8

Příspěvky na mezinárodních konferencích

DOSKOČIL, L., ENEV, V., PEKAŘ, M. *Spectroscopic characterization of water-extractable fractions from lignite*. Organic Geochemistry I-II: Trends for the 21st Century. Costa Adeje, Tenerife - Spain, European Association of organic Geochemists. 2013, p. 249–250.

DOSKOČIL, L., SZEWIECZKOVÁ, J., ENEV, V., PEKAŘ, M. *The analytical centrifuge LUMiSizer as a useful tool for the characterization of nanoparticles*. Frontiers in material and life sciences. 2014, p. 113–113. ISBN 978-80-210-7159-9

DOSKOČIL, L., SZEWIECZKOVÁ, J., ENEV, V., WASSERBAUER, J. *Determination of Mean Diameters and Particle Size Distributions Using Analytical Centrifuge*. Brno. 2015, p. 67– 67.

- ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M. *Elementární a spektrometrická charakterizace půdních huminových kyselin izolovaných z odlišných půdních matric. Časové změny půdních vlastností a jejich predikce*. Brno, Mendelova univerzita v Brně. 2013. p. 36–36. ISBN 978-80-7375-796-0.
- ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M. *Stationary and Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy of Humic Acids*. Organic Geochemistry: Trends for the 21st Century. Costa Adeje, Tenerife, Spain, European Association of Organic Geochemists. 2013, p. 199–200.
- ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M. *Study of lignite humic acids by modern spectroscopic methods*. Olomouc, *Chemické listy*. 2012, vol. 106, no. 6, p. 535–535. ISSN 0009-2770
- ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M., DOSKOČIL, L. *Time-Resolved Fluorescence Spectra of Different Soil Humic Acids and Standard IHSS Elliott Soil*. Conference Proceedings, 6th International Conference November 5th–7th 2014, Hotel Voronez 1, Brno, Czech Republic, EU. AMOS repro Ltd., Čs. Legií 8, 702 00 Ostrava, Česká republika, EU, TANGER Ltd., Keltičkova 62, 710 00, Ostrava, Česká Republika, EU. 2014, p. 168–169. ISBN 978-80-87294-55-0
- ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M., SMILEK, J., DOSKOČIL, L. *Methylation of humic acids – the impact on the reactivity, chemical composition and properties of HAs studied by spectrometric techniques*. 15th European Student Colloid Conference – Book of abstract. Kraków, Poland, EU, European Colloid & Interface Society. 2015, p. 111–111.
- ENEV, V., NOVÁK, F., KLUČÁKOVÁ, M. *Chemical and Spectroscopic Characterization of Humic Substances Isolated from South-Bohemian Peat*. Book of Abstracts: Natural Organic Matter: Structure-Dynamics Innovative Applications. Ioannina, Greece, Printing Office, University of Ioannina. 2014, p. 226–227.
- ENEV, V., NOVÁK, F., KLUČÁKOVÁ, M. *Elemental analysis, FTIR and ¹³C NMR of humic substances isolated from forest soil*. CEITEC PHD RETREAT, Valtice 23-24 April 2015, Book of abstracts. Brno, Masaryk University. 2015, p. 40–40. ISBN 978-80-210-7825-3
- ENEV, V., NOVÁK, F., KLUČÁKOVÁ, M., DOSKOČIL, L. *Physicochemical and Spectroscopic Characterization of Humic and Fulvic Acids Isolated from South-Bohemian Peat*. Book of Abstract: CEITEC Annual Conference "Frontiers in Material and Life Sciences". Masarykova univerzita, Brno, Česká republika, Masarykova univerzita. 2014, p. 121–121. ISBN 978-80-210-7159-9
- ENEV, V., NOVÁK, F., TÜRKEOVÁ, I., KLUČÁKOVÁ, M. *Humic substances from typical Czech forest soil Humic Podzol: Chemical and spectroscopic characterisation*. In *Proceedings of the 14th International Conference on Environmental Science And Technology, CEST2015, Proceedings of the International Conference on Environmental Science and Technology*. First. Rhodos, Greece, Global Network for Environmental Science and Technology (Global-NEST), University of the Aegean. 2015, p. 1–5. ISBN 978-960-7475-52-7. ISSN 1106-5516.
- ENEV, V., TÜRKEOVÁ, I., SZEWIECZKOVÁ, J., DOSKOČIL, L., KLUČÁKOVÁ, M. *Fluorescence analysis of Cu(II), Pb(II) and Hg(II) ion binding to humic and fulvic acids*. Chemistry & Life 2015, Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, September 2–4, 2015, Book of Abstracts. Brno, Czech Republic, Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Purkyňova 464/118, CZ-61200, Brno. 2015, p. 61–62. ISBN 978-80-214-5228-2
- KALINA, M., KLUČÁKOVÁ, M., ENEV, V. *Influence of Different Sources of Humic Acids, Applied Pre-treatment and Modifications on Their Behaviour in Aqueous Solutions*. Natural Organic Matter: Structure-Dynamics Inovative Application. Ioannina, Greece. 2014, p. 275–276.
- KLUČÁKOVÁ, M., ENEV, V., POSPÍŠILOVÁ, E. *Effect of Compost Application on Properties of Soil Humic Acids*. *Chemické listy*. Brno, Czech Chemical Society. 2011, vol. 105, no. 18, p. 897–897. ISSN 0009-2770
- MONDEK, J., DOSKOČIL, L., SZEWIECZKOVÁ, J., ENEV, V., WASSERBAUER, J. *Using the analytical centrifuge to characterize of magnetic particles*. CEITEC PHD RETREAT. 2015, p. 105–105. ISBN 978-80-210-7825-3

SZEWIECZKOVÁ, J., DOSKOČIL, L., ENEV, V., WASSERBAUER, J., PEKAŘ, M. *Comparison of Particle Size Distributions Measured Using Different Techniques*. Brno. 2015, p. 165–165.

TÜRKEOVÁ, I., ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M., KROUSKÁ, J., LAŠTŮVKOVÁ, M. *Thermodynamics of Metal Ion Interaction with Humic Acids*. Chemistry and life 2015. Brno, Czech republic, Brno University of Technology, Faculty of Chemistry. 2015, p. 60–61. ISBN 978-80-214-5228-2

TÜRKEOVÁ, I., KLUČÁKOVÁ, M., ENEV, V. *Isothermal titration calorimetry measurement for metal/humic acid interactions*. Mainz, Německo, IACIS 2015 . 2015, p. 87–87

Příspěvky na tuzemských a studentských konferencích

DOSKOČIL, L., ENEV, V., PEKAŘ, M. Effect of Bitumen on Sorption Properties of Lignite. In *XIV. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků, sborník příspěvků*. Brno, Masarykova univerzita. 2014, p. 28–31. ISBN 978-80-210-6842-1

ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M. Effects of industrial compost on chemical and spectroscopic properties of soil humic substances from Luvi-Haplic Chernozem. In *Studentská konference Chemie je život - Sborník abstraktů*. Brno, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno. 2012, p. 276–281. ISBN 978-80-214-4425-6

ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M., DOSKOČIL, L. Study of structure and chemical composition of different soil humic acids. In *Studentská konference Chemie je život*. Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno. 2013, p. 243–248. ISBN 978-80-214-4822-3

ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M., NOVÁK, F. Spectroscopic and Structural Analysis of Humic Substances Isolated from Forest Soil Humic Podzol-Locality Krkonoše, Czech Republic. In *Studentská odborná konference: Chemie je život 2014, Sborník příspěvků*. Brno, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno. 2014, p. 216–222. ISBN 978-80-214-5077-6

ENEV, V., KLUČÁKOVÁ, M., NOVÁK, F. Study of structure and chemical composition of soil humic substances isolated from Humic Podzol. In *Sborník příspěvků – XIV. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků*. Brno, Masarykova univerzita, Brno. 2014, p. 23–27. ISBN 978-80-210-6842-1

ENEV, V.; KLUČÁKOVÁ, M. Study of chemical composition and structure of different humic acids. In *XIII. pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků*. Brno, Mendelova univerzita v Brně. 2013, p. 163–164. ISBN 978-80-7375-757-1

SMILEK, J., SEDLÁČEK, P., KLUČÁKOVÁ, M., KALINA, M., ENEV, V. Methylation of humic acids - the impact on the reactivity studied by diffusion techniques. In *XIV. pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků - Sborník příspěvků*. Brno, Masarykova univerzita. 2014, p. 137–141. ISBN 978-80-210-6842-1

Souhrnné výzkumné zprávy

SEDLÁČEK, P., ENEV, V., KOLAJOVÁ, R., KLUČÁKOVÁ, M., KALINA, M. *Strukturní analýza produktů chemické oxidace lignosulfonanu*. 2014, p. 1–19.

SEDLÁČEK, P., ENEV, V., KOLAJOVÁ, R., KLUČÁKOVÁ, M., KALINA, M. *Výzkum a vývoj nových aplikačních produktů na bázi Lignohumátu - závěrečná zpráva etapy 2*. 2014, p. 1–19.

SEDLÁČEK, P., ENEV, V., OBRUČA, S., KLUČÁKOVÁ, M. *Výzkum využitelnosti vody BQ-2 (Bzenec) pro léčivé účely*. 2015, p. 1–19.

Školení

2011

Kurz měření vibračních spekter, VŠCHT Praha

2013

Kurz interpretace vibračních spekter, VŠCHT Praha

Stáž

2013

Biologické centrum AV ČR, v. v. i., České Budějovice;
pracoviště Dr. F. Nováka. Téma stáže: Gelová permeační
chromatografie HL

Vedoucí bakalářské práce 2013/2014

Nikol Machátová; Téma bakalářské práce: *Komplexní
fyzikálně-chemická analýza přírodní léčivé vody*

ABSTRAKT

Hlavním cílem disertační práce bylo studium fyzikálně-chemických vlastností huminových látek (HL) prostřednictvím moderních instrumentálních technik. Předmětem studia této disertační práce byly HL izolované z jihomoravského lignitu, jihočeské rašeliny, lesní půdy *Humic Podzol* a extraktu hnědé mořské řasy *Ascophyllum nodosum*. S ohledem na poznání struktury a reaktivity těchto unikátních “biokoloidních” sloučenin byly mimo jiné studovány i standardy, které jsou dodávány mezinárodní společností pro výzkum huminových látek tzn. Leonardite HK, Elliott Soil HL a Pahokee Peat HL. Za tímto účelem byly veškeré HL charakterizovány pomocí elementární analýzy (EA), molekulové absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického záření (UV/Vis), infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), spektrometrie nukleární magnetické resonance isotopu uhlíku ^{13}C (LS ^{13}C NMR), ustálené a časově rozlišené fluorescenční spektrometrie. Z naměřených fluorescenčních, UV/Vis a ^{13}C NMR spekter byly vypočteny fluorescenční indexy, absorpční koeficienty, hodnoty specifických absorbancí a strukturní parametry, které byly využity k základní charakterizaci těchto “biokoloidních” sloučenin. Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací byla použita k identifikaci funkčních skupin a strukturních jednotek studovaných HL. V oblasti “otisku palce” tzv. *fingerprintu* komplikují identifikaci infračervených spekter HL překrývající se absorpční pásy jednotlivých funkčních skupin. Tento problém byl řešen pomocí Fourierovy autodekonvoluce. Stacionární fluorescenční spektrometrie byla využita k detailnější charakterizaci použitých HL s ohledem na poznání jejich původu, jednotlivých strukturních jednotek, množství substituentů uplatňujících elektron-donorní a elektron-akceptorní efekt, obsahu reaktivních funkčních skupin, “molekulární” heterogenity, stupně humifikace aj. Pomocí upravené Stern-Volmerovy rovnice byly získány parametry komplexace vzorků Elliott Soil s Cu^{2+} , Pb^{2+} a Hg^{2+} ionty, které jsou základními kritérii posouzení reaktivity těchto “biokoloidních” sloučenin. Klíčovou oblast celé disertační práce pak tvoří časově rozlišená fluorescenční spektrometrie. Poprvé je zde použita metoda tzv. časově rozlišených přes plochu normalizovaných spekter (TRANES), ze kterých lze určit, zda pozorovaná emise HL pochází ze dvou či více emisních jednotek, nebo pouze z jedné. Z průběhu časově rozlišených emisních spekter (TRES) bylo usuzováno o viskozitě mikroprostředí okolo excitovaných fluoroforů HL.

KLÍČOVÁ SLOVA

huminové látky, van Kreveleného diagram, absorpční koeficienty, Fourierova autodekonvoluce, fluorescenční maxima, reaktivita, komplexace, ^{13}C NMR spektrometrie, isoemisní bod, hydrofobní domény

ABSTRACT

The main aim of doctoral thesis is the study on physicochemical properties of humic substances (HS) by modern instrumental techniques. The subject of the study were HS isolated from South Moravian lignite, South Bohemian peat, forest soil *Humic Podzol* and finally extract from brown sea algae *Ascophyllum nodosum*. With respect on determination of structure and reactivity of these unique “biocolloids”, standard samples (*Leonardite* HA, *Elliott Soil* HS and *Pahokee Peat* HS) were also studied. These samples were obtained from International Humic Substances Society (IHSS). All mentioned substances were characterized by elemental analysis (EA), molecular absorption spectroscopy in ultraviolet and visible region (UV/Vis), infrared spectroscopy with Fourier transformation (FTIR), nuclear magnetic resonance spectroscopy of carbon isotope ^{13}C (LS ^{13}C NMR), steady-state and time resolved fluorescence spectroscopy. Obtained fluorescence, UV/Vis and ^{13}C NMR spectra were used for calculation of fluorescence and absorption indexes, values of specific absorbance and structural parameters respectively, which were used for fundamental characterization of these “biocolloidal” compounds. Infrared spectroscopy with Fourier transformation was utilized for the identification of functional groups and structural units of HS. Evaluation of infrared spectra is quiet complicated by overlapping of absorption bands especially in fingerprint region. This problem was overcome by Fourier self-deconvolution (FSD). Steady-state fluorescence spectroscopy was used for deeper characterization of HS with respect to origin, structural units, amount of substituents with electron-donor and electron-acceptor effects, content of reactive functional groups, “molecular” heterogeneity, the degree of humification, etc. Parameters of complexation of samples *Elliott Soil* with heavy metal ions (Cu^{2+} , Pb^{2+} and Hg^{2+}) were obtained by using modified Stern-Volmer equation. These ions were chosen purposefully, because the interaction of HS with these ions is one of the fundamental criteria for the assessment of the reactivity of HS. Key part of the whole doctoral thesis is time-resolved fluorescence spectroscopy. It is able to determine the origin of emission of HS by method Time-Resolved Area Normalized Emission Spectra (TRANES). The viscosity of micro medium about excited fluorophores of HS was determined by Time-Resolved Emission Spectra (TRES).

KEYWORDS

humic substances, van Krevelen diagram, absorption coefficients, Fourier self-deconvolution, fluorescence maxima, reactivity, complexation, ^{13}C NMR spectroscopy, isoemission point, hydrophobic domains